



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIA DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD ANIMAL
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

EFFECTO DE LA SEROTONINA EN CÉLULAS TRONCALES ESPERMATOGÉNICAS DE RATA WISTAR
TESIS
QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS DE LA PRODUCCIÓN Y DE LA SALUD
ANIMAL

P R E S E N T A:
MARÍA ISABEL CORONADO MARES

TUTOR:
FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ TREJO
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA

COMITÉ TUTORAL:
MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM
LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO
FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO, DICIEMBRE DE 2021



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNIA

Posgrado en Ciencia de la Producción y de la Salud Animal

Título

Efecto de la Serotonina en células troncales espermatogénicas de rata wistar

TESIS

**Para obtener el grado de Maestra en Ciencias de la Producción y de la Salud
Animal**

P R E S E N T A:

MARÍA ISABEL CORONADO MARES

**TUTOR: FRANCISCO JAVIER JIMÉNEZ TREJO
INSTITUTO NACIONAL DE PEDIATRÍA**

COMITÉ TUTORAL:

MARCO ANTONIO CERBÓN CERVANTES

FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM

LUIS ALBERTO ZARCO QUINTERO

FACULTAD DE MEDICINA VETERINARIA Y ZOOTECNÍA, UNAM

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia y al Instituto Nacional de Pediatría.

Al Dr. Francisco Javier Jiménez Trejo por ofrecerme su apoyo como tutor para brindarme todas las enseñanzas y conocimiento para la realización de este proyecto de manera incondicional y por cada uno de sus consejos en el laboratorio en el Instituto Nacional de Pediatría.

A la Dra. Rosa María Viguera Villaseñor por permitirme trabajar en su laboratorio de biología de la reproducción en el Instituto Nacional de Pediatría y facilitarnos su equipo de laboratorio y al acceso al laboratorio nacional de citometría de flujo.

Al Dr. Marco Antonio Cerbon Cervantes por siempre apoyarme, por ser una base en la construcción de mi vida en la investigación, por cada uno de sus consejos, por motivarme cada día para ser un gran ser humano y por hacerme parte de un estudiante de su laboratorio, en donde pude realizar gran parte de este proyecto en la Facultad de Química.

Al M. en C. Carlos Castellanos Barba coordinador de operaciones en el Laboratorio Nacional de citometría de Flujo, por su apoyo y capacitación para poder acceder a cada uno de los equipos utilizados en la realización de este proyecto.

Es importante mencionar que este proyecto conto con el apoyo de los Proyectos 014/2016 y 046/2019 con aprobación de los Comités de Investigación, de Bioseguridad y CICUAL del INP y el apoyo del Laboratorio de Biología de la Reproducción del INP. Y al patrocinio del CONACYT con el numero de proyecto 579615.

RESUMEN

La investigación de Spermatogonial Stem Cell (SC), se ha convertido en un excelente sistema in vitro para el estudio de algunos trastornos reproductivos en animales y/o humanos lo cual constituye un amplio campo para la búsqueda de terapias para infertilidad/esterilidad y/o cáncer testicular en machos. Nuestro grupo ha descrito la presencia de un sistema serotoninérgico intrínseco en testículos, epidídimo y espermatozoides (rata, caballo, murciélago, humano), indicando que la serotonina puede influir directa y/o indirectamente en procesos de espermatogénesis y/o síntesis de testosterona. En el presente proyecto nos planteamos identificar si la serotonina influye en la espermatogénesis en rata de la cepa Wistar. Se realizaron cultivos primarios de testículos de ratas de 15 dpn y con la técnica de citometría de flujo se aislaron las células SSC tipo As positivas para CD9+. Posteriormente se realizaron ensayos de inmunofluorescencia para identificar a los receptores de serotonina, enzimas de síntesis y degradación y transportadores. Se evaluó in vitro el efecto de la serotonina sobre el funcionamiento mitocondrial utilizando el marcador fluorescente Mitotracker-Red FM™ a tiempos cortos (5, 10, 30 min). Los resultados demuestran que las SSC As expresan per se a los receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{3A}, y a las enzimas de síntesis y degradación de serotonina. Por otro lado, el tratamiento a tiempos cortos con serotonina demostró que las mitocondrias incrementan su afinidad por el Mitotracker-Red FM™; y este efecto es acompañado por la activación las proteínas fosforiladas de tirosinas, CREBp y el factor liberador de corticotropina (CRF). En conjunto, nuestros resultados demuestran que las SSC As expresan la maquinaria de receptores y enzimas serotoninérgicas lo que permite incrementar la actividad funcional en las mitocondrias, sin embargo, se requieren más estudios moleculares y fisiológicos para conocer los alcances que esta molécula puede tener en la reproducción masculina.

Palabras clave: Serotonina, Espermatogénesis, Espermatogonia, Mitocondrias,

ABSTRACT

Spermatogonial Stem Cell (SC) research has become an excellent *in vitro* system for the study of some reproductive disorders in animals and/or humans, which constitutes a wide field for the search of therapies for infertility/sterility and/or testicular cancer in males. Our group has described the presence of an intrinsic serotonergic system in testes, epididymis and spermatozoa (rat, horse, bat, human), indicating that serotonin can directly and/or indirectly influence spermatogenesis and/or testosterone synthesis processes. In the present project we set out to identify whether serotonin influences spermatogenesis in the Wistar strain rat. Primary cultures of 15 dpn rat testis were cultured and CD9⁺ type SSC As cells were isolated by flow cytometry. Subsequently, immunofluorescence assays were performed to identify serotonin receptors, enzymes of synthesis and degradation and transporters. The effect of serotonin on mitochondrial functioning was assessed *in vitro* using the fluorescent marker Mitotracker-Red FMTM at short times (5, 10, 30 min). The results demonstrate that SSC As express *per se* 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{3A} receptors, and serotonin synthesis and degradation enzymes. On the other hand, treatment at short times with serotonin showed that mitochondria increase their affinity for Mitotracker-Red FMTM; and this effect is accompanied by activation of tyrosine phosphorylated proteins, CREBp and corticotropin-releasing factor (CRF). Taken together, our results demonstrate that SSC As express the serotonergic receptor and enzyme machinery allowing increased functional activity in mitochondria, however, further molecular and physiological studies are required to know the scope that this molecule may have on male reproduction.

Keywords: Serotonin, Spermatogenesis, Spermatogonia, Mitochondria, Cytometry.

ÍNDICE

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
I. INTRODUCCION	1
1.1 EL DESARROLLO TESTICULAR EN RATAS	1
DESARROLLO TESTICULAR POSNATAL Y PUBERAL EN RATAS	2
1.2 NICHOS DE CÉLULAS TRONCALES	4
1.3 EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS TRONCALES EN LA ACTUALIDAD.	5
1.4 PROGRAMACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES	7
1.5 ASPECTOS GENERALES DE LA SEROTONINA (NEUROTRANSMISOR Y/O NEUROHORMONA)	9
1.5.1 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA SEROTONINA	9
1.5.2 LA SEROTONINA EN LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA MASCULINA	12
1.5.3 LA SEROTONINA IMPLICADA EN EL SUPERVIVENCIA DE CELULAS TESTICULARES	16
1.6 LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y SU EFECTO EN LA REPRODUCCION SEXUAL EN MACHOS	18
1.7 EL USO DE CITOMETRIA DE FLUJO COMO UNA HERRAMIENTA EN LA FISIOLOGIA DE LA REPRODUCCION	19
1.7.1 EL SORTING COMO UN METODO DE AISLAMIENTO DE CELULAS SSC	19
II. JUSTIFICACIÓN	22
III. HIPÓTESIS	22
IV. OBJETIVO GENERAL	22
OBJETIVOS PARTICULARES	23
V. MATERIAL Y METODOS	23
5.1 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN	23

5.2	ETAPA I. OBTENCIÓN DE LOS ORGANOS REPRODUCTIVOS DE RATAS WISTAR MACHO	24
5.3	ETAPA II: AISLAMIENTO CELULAR DE SSC MEDIANTE LA ESTANDARIZACION DEL CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS TESTICULARES	25
5.4	CARACTERIZACION DE CELULAS CD9 ⁺ MEDIANTE MARCADORES TRANSMEMBRANALES	26
5.5	SEPARACIÓN CELULAR MEDIANTE SORTING	27
5.6	PRUEBAS DE IMMUNOFLUORESCENCIA PARA EL SISTEMA SEROTONINERGICO	27
5.7	DETERMINACION DE LA FUNCION MITOCONDRIAL CON EL USO DE COLORANTES POR CITOMETRIA DE FLUJO	29
5.8	DETERMINACION DE LA EXPRESION DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS DE TIROSINA Y DEL FACTOR LIBERADOR DE CORTICOTROPINA	30
VI.	RESULTADOS	31
6.1	IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CÉLULAS CD9 ⁺ MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO.	31
6.2	SEPARACIÓN CELULAR DE CD9 ⁺ MEDIANTE LA TÉCNICA DE SORTING	34
6.3	IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA EN CÉLULAS SSC	36
6.4	IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES SEROTONINÉRGICOS EN CÉLULAS SSC AS	38
6.5	EFECTO DE SEROTONINA EN LA FUNCION MITOCONDRIAL DE SSC	40
6.6	FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DE TIROSINA	45
6.7	EXPRESIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA CREBP Y DEL FACTOR LIBERADOR DE CORTICOPROPINA (FLC).	46
VII.	DISCUSIÓN	49
VIII.	CONCLUSIONES GENERALES	58
IX.	PERSPECTIVAS	59
X.	BIBLIOGRAFÍA	60

Listado de figuras

<i>FIGURA 1 Análisis para la población SSC As CD9, mediante citometría de flujo. Dot plots para estandarizar de la edad de las ratas.</i>	32
<i>FIGURA 2 Análisis para la población SSC As CD9, mediante citometría de flujo. Dot plots para 15 dpn.</i>	33
<i>FIGURA 3 Equipos y software de FACSAria utilizados para el sorting de la población SSC.</i>	34
<i>FIGURA 4 Micrografía representativas de los co-cultivos de la población SSC As en campo claro.</i>	35
<i>FIGURA 5 Inmunofluorescencia que revela a la expresión de OCT4, c-kit, SOX-2 y AP2 gama en SSC As.</i>	37
<i>FIGURA 6 Microfotografías que muestran reacción inmunofluorescente para diferentes marcadores serotoninérgicos en SSC As CD9+</i>	39
<i>FIGURA 7 Análisis para la población SSC As CD9+, mediante citometría de flujo para la determinación del efecto de serotonina 1, 10 y 15 μM.</i>	41
<i>FIGURA 8 Gráfica dosis-respuesta para efecto de serotonina 1, 10 y 50 μM.</i>	42
<i>FIGURA 9 Análisis para la población SSC As CD9+, mediante citometría de flujo para la determinación del efecto de serotonina a 50 μM 1, 10 y 30 minutos.</i>	43
<i>FIGURA 10 Gráfica dosis-respuesta para efecto de serotonina 1, 10 y 30 min.</i>	44
<i>FIGURA 11 Microfotografías de la fosforilación de tirosinas en SSC As CD9+</i>	47
<i>FIGURA 12 Inmunofluorescencia para marcadores como CREBp y el factor Liberador de Corticotropina (CRF) en las SSC As.</i>	48

I. INTRODUCCION

1.1 EL DESARROLLO TESTICULAR EN RATAS

La embriogénesis testicular en mamíferos, como la rata, puede ser dividida en dos fases. La primera es la fase indiferenciada, caracterizada por la aparición de las gónadas bipotenciales que surgen como estructuras pares a partir de la cresta urogenital, la cual es un engrosamiento del mesodermo en la pared dorsal del celoma embrionario, formado durante la gastrulación del embrión (Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 2003; Ishii et al., 2012). Desde el punto de vista celular, la gónada bipotencial está conformada por cuatro tipos celulares, las células germinales primordiales (PGC) y tres poblaciones de células somáticas, entre las cuales tenemos a los precursores de las células de soporte o células de Sertoli, que derivan de las células del epitelio celómico, a los precursores de células esteroidogénicas (que darán origen a células de Leydig) y finalmente células del tejido conjuntivo (a partir de las cuales se formará el tejido vascular, la túnica y las células peritubulares mioides) (Phillips et al., 2010). En el día 13 de la gestación de la rata ocurre la fase de diferenciación, que comprende la expresión del gen determinante del sexo (SRY) localizado en el cromosoma Y que se diferencia la gónada bipotencial en testículo, o en su ausencia de este gen la gónada se diferencia por “default” en ovario. En el caso de los machos la expresión de el gen SRY conduce a la diferenciación de las células de Sertoli, las que actúan como centro organizador de la gónada masculina, orquestando la formación de los cordones testiculares y la diferenciación de los demás tipos celulares del testículo (Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 2003; Fayomi & Orwig, 2018).

Las células germinales primordiales (PGC) migran a la cresta genital y proliferan por mitosis para incrementar el número de gonocitos dentro de los cordones testiculares, hasta llegar al día 18 de gestación, cuando entran en detención mitótica (estado de quiescencia), en el que se mantendrán hasta unos pocos días después del nacimiento (Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 2003; Zwaka, 2005). Las

células peritubulares mioideas también migran hacia la gónada masculina para formar una capa de células aplanadas que rodean a los cordones sexuales y contactan con las células de Sertoli (Huckins, 1971). Hacia el día 20 de la gestación en las ratas y poco antes del nacimiento, el número de células de Sertoli aumenta rápidamente, mostrando un período de actividad mitótica más intenso, y siguen proliferando hasta después del nacimiento (Hess & França, 2005).

En este momento, las células de Leydig fetales se agrupan cerca de los vasos sanguíneos y aumentan su número durante la gestación, alcanzando el pico máximo antes del nacimiento. Estas células comienzan a sintetizar y secretar andrógenos en una fase temprana del desarrollo, provocando un pico de testosterona plasmática a los días 18 y 19 de gestación (de Rooij, 2017).

DESARROLLO TESTICULAR POSNATAL Y PUBERAL EN RATAS

Al nacer, en los testículos se observan cordones sexuales con gonocitos en posición central, que sufren divisiones mitóticas rápidas y continuas en los primeros días de vida con el fin de aumentar la población de este tipo celular (de Rooij, 2017). Gradualmente a partir del 5º día de vida, los gonocitos migran del centro a la periferia de los cordones sexuales para alcanzar la lámina basal y diferenciarse en células madre espermatogénicas o espermatogonias indiferenciadas (Spermatogonial Stem Cell, SSC), momento en el cual cesa su proliferación (Phillips et al., 2010). El desarrollo normal de los gonocitos en los primeros días postnatales es crítico para el desarrollo de una espermatogénesis apropiada en el adulto (Merchant-Larios & Moreno-Mendoza, 2003; de Rooij & Russell, 2000).

La supervivencia y el desarrollo de las SSC depende de un microambiente especializado (nicho espermatogénico), que es proporcionado por las células de Sertoli, las células peritubulares mioideas y las células intersticiales o de Leydig (Hai et al., 2014). Las células de Sertoli ofrecen nutrientes y factores de crecimiento testicular. Estas células continúan proliferando hasta el día 16 postnatal y luego

detienen su multiplicación (Ventelä et al., 2012). Las células peritubulares mioides participan en la transducción de las señales entre el intersticio y el compartimiento tubular mediante la secreción de factores de crecimiento como el factor de crecimiento epidermal (EGF), factor de crecimiento tipo Beta (TGF-beta), factor de crecimiento neuronal (NGF) (Kubota et al., 2004a, 2004b). Por otra parte, las células de Leydig secretan testosterona (T4) para mantener la espermatogénesis (Yu et al., 2014). El ambiente del nicho endocrino logra el equilibrio entre la auto-renovación de las células madre espermatogénicas (SSC) y su diferenciación a espermatogonias diferenciadas tipo A (Fayomi & Orwig, 2018).

De este modo, las SSC pueden diferenciarse en espermatogonias As (A single), espermatogonias Ap (A pair) y espermatogonias Aal (A aligned), las que iniciarán la espermatogénesis, para posteriormente dividirse y diferenciarse sucesivamente en espermatogonias A1, A2, A3, A4, A Intermedia y B, de tamaño progresivamente menor y cada vez con mayor compactación de la cromatina. Las espermatogonias tipo B pierden contacto con la lámina basal de los cordones sexuales y finalmente dan lugar a los espermátocitos primarios (de Rooij, 2017; Fayomi & Orwig, 2018; Phillips et al., 2010).

Entre los 17 y 18 días comienza la meiosis, que se realiza a partir de los espermátocitos primarios, los que, mediante dos divisiones meióticas sucesivas, se diferenciarán primero en espermátocitos secundarios y luego en espermátidas, las cuales se pueden observar por primera vez entre los 24 y 25 días de edad (Lagos-Cabre & Moreno, 2008). En la rata, la aparición de los primeros espermatozoides en la luz de los cordones sexuales, se observan aproximadamente a los 45 días de edad, momento en el que algunos autores consideran que se alcanza la pubertad, comprendiendo la finalización de la primera oleada espermatogénica y la formación casi final de los túbulos seminíferos (Cheng, 2014). Las células de Sertoli en este momento maduran y sufren transformaciones, incluyendo los cambios morfológicos con nucléolo grande y tripartita, la pérdida de actividad proliferativa, y la formación de la barrera hemato-testicular (Cheng, 2014; Hai et al., 2014). Es importante

señalar que en estas etapas las células de Sertoli secretan niveles altos del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (Kubota et al., 2004a; Phillips et al., 2010).

En estudios en humanos se ha encontrado que en los testículos fetales y de adultos se expresa GDNF, que puede ser detectado en células de Leydig y células de Sertoli (Hime & Abud, 2013; Phillips et al., 2010). Sin embargo, sólo puede detectarse un alto nivel de expresión de GDNF en la etapa de formación de espermátidas redondas, lo que sugiere, que es un factor que desempeña un papel de regulación y diferenciación celular durante la espermatogénesis (Spinnler et al., 2010), y es detectable alrededor del día 10 al día 15 postnatal. Para nuestros estudios, este dato se convirtió en un factor clave y de suma importancia para realizar la estandarización de la edad que utilizamos y en la cual podríamos encontrar un mayor número de células SSC sin diferenciarse a otro estadio.

1.2 NICHOS DE CÉLULAS TRONCALES

Para asegurar el mantenimiento y la auto-renovación, es necesario que las células troncales o stem cell (SC), reciban señales esenciales provenientes de su “nicho” (Kostereva & Hofmann, 2008). El término nicho originalmente se utilizó para referirse al microambiente que soporta a las células troncales hematopoyéticas humanas, sin embargo, actualmente se han identificado nichos en la mayoría de los tejidos de modelos animales, lo que incluye al intestino, mucosa gingival, piel, cerebro y testículos entre otros tejidos/órganos (Kostereva & Hofmann, 2008; Ryu et al., 2005). Los nichos en los tejidos locales mantienen y regulan la función de las SC mediante estímulos extrínsecos y están formados por las células de soporte circundantes (Oatley & Brinster, 2008). Estas estructuras han sido caracterizadas en tejidos de invertebrados mediante el uso de métodos que permiten identificar a las SC individuales y sus mecanismos de regulación y proliferación (Morrison & Spradling, 2008).

En el caso de los testículos, las células de Sertoli son las principales formadoras del nicho de SSC, pero otras células somáticas testiculares, como las células mioideas peritubulares, las células de Leydig y la membrana basal de los túbulos seminíferos también contribuyen a mantener el nicho (Oatley & Brinster, 2008).

Las SSC son las responsables del mantenimiento de la espermatogénesis a lo largo de la vida de los machos mediante la producción continua de espermatogonias tipo A hacia tipo B, intermedias y luego hacia espermátocitos (1arios, 2arios), luego hacia espermátidas redondas y elongadas que se diferenciarán finalmente en espermatozoides (Kubota & Brinster, 2018). Las SSC se alojan en el compartimiento basal del epitelio seminífero. Estas células son las únicas en este órgano que se auto renuevan a lo largo de la vida del animal y a partir de ellas se generan los gametos que transmiten la información genética a la siguiente generación. Las SSC son células individuales e indiferenciadas, que no se encuentran conectadas por puentes intercelulares con otras células germinales más avanzadas. Las SSC se forman después del nacimiento y persisten durante toda la vida de los machos (Oatley & Griswold, 2017).

En comparación con el resto de las células testiculares, las SSC son escasas, pues su concentración estimada es de 1 en 3,000 o 4,000 células o corresponden al 0.01 al 0.02% del total presentes en cada testículo (Oatley & Griswold, 2017; Orwig & Hermann, 2010), por lo que es importante generar más conocimientos sobre sus características fenotípicas, genotípicas y los mecanismos que regulan su función.

1.3 EL ESTUDIO DE LAS CÉLULAS TRONCALES EN LA ACTUALIDAD.

La investigación de las SC ha recibido gran interés público y científico debido a su amplio potencial clínico como resultado de su capacidad de auto-renovación, diferenciación celular y por último, la reparación funcional de órganos o tejidos (Koch et al., 2008; Ryu et al., 2005).

Los avances en la investigación con células SC, han conducido al concepto de la medicina regenerativa, que se basa en el potencial de las SC trasplantadas para terapias que ayuden en la reparación de tejidos dañados o degenerados (Piscaglia, 2008). Además del potencial terapéutico que representa la tecnología de las SC, constituyen un excelente sistema *in vitro* para el estudio de diversas patologías y/o algunas enfermedades adquiridas (i.e. diabetes mellitus tipo 2, trastornos hematológicos, infertilidad), usando diversos modelos animales, pero en estos últimos años se ha generado la posibilidad de preservar especies en peligro de extinción (Battler & Leor, 2006; Siqueira, 2011). Esta tecnología puede generar una mejor terapéutica para pacientes de enfermedades como el cáncer, en el cual las terapias son basadas en la radiación o en el uso de fármacos agresivos que pueden generar efectos adversos y en el peor de los casos la muerte (Dobrev et al., 2010; Scadden & Srivastava, 2012). Tema derivado ahora de la medicina alternativa de reciente generación como lo es la Oncofertilidad, la cual se encarga de salvaguardar las gónadas de pacientes que serán sometidos a radio o quimioterapia.

Las SC han sido clasificadas por su potencialidad y su capacidad de diferenciación en células troncales embrionarias (o por su nombre en inglés: embryonary stem cell, ESC) y en células troncales adultas o somáticas (CTS). Las ESC son totipotenciales. Únicamente el cigoto y las descendientes de las dos primeras divisiones son células totipotenciales, por lo que tienen la capacidad de formar tanto al embrión como al trofoblasto de la placenta. En cambio, las CTS solamente son pluripotentes, multipotentes o unipotentes (Alison & Islam, 2009). Las ESC se pueden obtener de la masa celular interna del blastocito, mientras que las CTS se originan de varios tejidos de los organismos adultos (Phinney, 2011).

Diversos estudios han mostrado que las CTS pueden diferenciarse en células distintas a las del tejido del que se originaron por lo que conservan su pluripotencialidad (Scadden & Srivastava, 2012). En todo caso, a pesar de que el potencial de diferenciación de las ESC es superior al de las CTS, la investigación con este tipo de células ha sido obstaculizada por cuestiones éticas y

gubernamentales. En cambio, la investigación con CTS se ha desarrollado a un paso más rápido y con más aplicaciones clínicas y de preservación de especies (Y. Lin & Chen, 2014), (Y.-N. Lin & Matzuk, 2014). La investigación en el uso de las CT requiere de herramientas que permitan entender los mecanismos que controlan el mantenimiento de su auto renovación y su diferenciación fenotípica en los tejidos, así como moléculas que participan en estas funciones (Cheng, 2014; Phinney, 2011)

1.4 PROGRAMACIÓN DE CÉLULAS TRONCALES

Por otro lado, se considera que la andrología tanto animal como humana se ha retrasado en el uso de las SC como herramienta terapéutica. Las investigaciones en humanos se han concentrado en dos áreas principales: el tratamiento de la disfunción eréctil y la solución de casos de infertilidad idiopática (Cannarella et al., 2020; Poongothai et al., 2009). Con respecto a la infertilidad masculina (Toyooka et al., 2003), mostraron que es posible generar células troncales espermatogénicas (SSC), a partir de ESC (Roy, 2017). Posteriormente, se observó que los trasplantes de SSC pueden restaurar la espermatogénesis (Rodrigues & Roelen, 2020). Trasplantes de SSC de un donador al testículo de un animal infértil fueron descritos por primera vez en 1994 (Kim et al., 1997).

Esta técnica fue desarrollada primeramente en roedores, pero su uso se ha extendido a varias especies, lo que incluye animales domésticos, aves y peces (Honaramooz et al., 2008; Leal et al., 2009; Nóbrega et al., 2009). Recientemente, con técnicas de autotrasplante de testículos en primates se ha logrado generar “organoides” en los que su histomorfología semeja un testículo con presencia de espermatozoides que han sido utilizados *in vitro* para inyección intracitoplásmica de espermatozoides o ICSI (por sus siglas en inglés: intracytoplasmic sperm injection), con los que se ha logrado un desarrollo embrionario y fetal exitoso para obtener crías sanas de la misma especie (Carney et al., 2012).

Existen tres aplicaciones principales para la tecnología del trasplante de SSC en animales y humanos:

- 1) En humanos: Mejorar la tecnología del trasplante de espermatogonias para la solución de problemas de fertilidad secundarios al tratamiento con quimio o radioterapia con lo que se puede mejorar la calidad de vida de los pacientes (Oncofertilidad).
- 2) En animales; Contribuir a la conservación y propagación de especies en peligro de extinción, ya que el trasplante de células germinales intra o Inter especies ofrece una alternativa para preservar el potencial reproductivo de individuos con alto valor genético-evolutivo.
- 3) Proporcionar elementos en la comprensión de los mecanismos involucrados en la autorrenovación y diferenciación de las células germinales y sus nichos dentro de los testículos (Kubota et al., 2003; Oatley & Brinster, 2008; Ryu et al., 2003).

Bajo estos preceptos, el conocimiento sobre el manejo de las SSC y sus posibles vías de regulación en diferentes niveles, como lo son a nivel molecular, bioquímico y/o fisiológico, así como la participación de neuro-factores tales como la serotonina y otros (dopamina, acetilcolina, adrenalina), que pudieran estar implicados en estos procesos de diferenciación, proliferación, supervivencia y/o apoptosis son fundamentales para estudiar en los siguientes años.

1.5 ASPECTOS GENERALES DE LA SEROTONINA (NEUROTRANSMISOR Y/O NEUROHORMONA)

1.5.1 FUNCIONES BIOLÓGICAS DE LA SEROTONINA

En el Sistema Nervioso Central (SNC), los neurotransmisores tienen un papel protagónico en la regulación de diversas señales celulares durante el desarrollo fetal, después del nacimiento y en la vida adulta (migración, diferenciación, apoptosis, mitosis). La serotonina o 5-Hidroxitriptamina (5-HT; $C_{10}H_{12}N_2O$), es una molécula conocida esencialmente como neurotransmisor, ya que tiene funciones principalmente en el SNC.

La serotonina fue el primer neurotransmisor al que se le atribuyó una participación como señalizador del desarrollo en el cerebro; también como mensajero entre neuronas y se conoce que se produce principalmente en las regiones del tallo cerebral (o brainstem por su nombre en inglés). Las neuronas del núcleo del rafe localizadas en el tallo cerebral forman un agregado celular que conforma la columna medial del tallo o tronco encefálico y de ahí su distribución a lo largo del cerebro y médula espinal (Adayev et al., 2005).

También se conoce que en algunos órganos periféricos del cuerpo (corazón, pulmón, intestino, epidídimo, testículo, ovario, entre otros) tienen sitios específicos de producción de serotonina (Fukumoto et al., 2005).

La serotonina es una amina biogénica del grupo de las indolaminas, es sintetizada a partir del aminoácido esencial L-triptófano (L-Trp). La enzima limitante de la biosíntesis de serotonina es el triptófano 5-hidroxilasa (TPH). Esta enzima, como su nombre lo indica, se encarga de agregar un hidroxilo en la posición 5 del anillo indol de la molécula del L-Trp, dando origen al 5-hidroxitriptófano e implica la acción de una de las dos isoenzimas principales en su conversión; la TPH tipo 1 (TPH1), la cual se localiza en órganos periféricos y la isoforma central (TPH2; exclusiva del

SNC). Inmediatamente después, enzimas ubicuas como las descarboxilasas de aminoácidos aromáticos quitan el grupo carboxilo de la molécula, obteniéndose 5-hidroxitriptamina o serotonina (Gaspar et al., 2003; Walther & Bader, 2003). Posteriormente la enzima encargada de su catabolismo, la monoaminoxidasa tipo A (MAO_A; periférica) y/o tipo B (localizada en el SNC); se encargarán de su catabolismo o degradación (Walther & Bader, 2003).

Inmediatamente después de su liberación, las neuronas serotoninérgicas pueden recapturar de manera activa con apoyo del transportador membranal (5-HT_T), el cual modula la concentración de serotonina en el líquido extracelular de los tejidos, ya que una vez que esta sustancia se produce debe ser transportada hacia las regiones cerebrales específicas o de los tejidos periféricos. Esta acción se lleva a cabo por medio de una proteína vesicular de transporte proteico (VMAT1, VMAT2), que es capaz de transportar la serotonina dentro del sitio de sinapsis o de su liberación para iniciar cascadas de señalización por segundos mensajeros (Fukumoto et al., 2005; Gaspar et al., 2003; Walther & Bader, 2003).

Una parte de la serotonina puede ser inactivada para la formación de ácido 5-hidroxiindoleacético (5-HIAA) por parte de las enzimas monoaminoxidasa tipo A y B. Es en forma de 5-HIAA, como deberá ser excretado del organismo por vía urinaria. En algunos estudios relacionados con la fertilidad se ha visto una correlación positiva entre mayor cantidad de metabolito 5-HIAA y serotonina con infertilidad en estos pacientes (i. e. azoospermia; (Ishikawa & Takeshima, 1984).

Por otro lado, los diversos efectos de la serotonina son mediados por vía de una familia extensa de receptores (con 7 subtipos), desde 5-HT₁ hasta 5-HT₇, la mayoría de ellos asociados a proteína G, aunque los del grupo 3 son receptores tipo canal, ya que están unidos a un ligando que abre un canal iónico Na⁺/K⁺ parecido a los que son regulados por el ácido gamma-aminobutírico (GABA) y ácido N-metil-D-aspartico (Mohammad-Zadeh et al., 2008). Esta asociación resulta en la despolarización de membrana. Los receptores 5-HT₁ Y 5-HT₅ están asociados

negativamente a la adenilato-ciclasa por lo que no hay síntesis de AMPc. La activación de los receptores del grupo 2 regulan la producción de diacilglicerol (DAG) e inositol trifosfato (INP₃), dando como resultado la liberación de iones de Calcio (Ca²⁺) desde las pozas de almacenamiento de las células.

Los demás grupos incrementan la actividad de AMPc (Mohammad-Zadeh et al., 2008). La serotonina tiene diversas funciones no neuronales, por ejemplo, participa en la embriogénesis temprana (Buznikov et al., 2001; Fukumoto et al., 2005), (proliferación celular, migración, diferenciación y morfogénesis), el comportamiento humano (Marino et al., 2010) y existen artículos que mencionan que actúa como un factor de crecimiento en muchos tipos de células no tumorales (Siddiqui et al., 2006). También, se ha visto implicada en padecimientos como hipertensión arterial (Pytliak et al., 2011). Una de las funciones más estudiadas de la serotonina es la vasoconstricción; un incremento en la concentración de serotonina en el suero sanguíneo de ratas puede provocar disminución del flujo sanguíneo en diferentes órganos, incluyendo al testículo (Kinson et al., 1973).

Así mismo, se ha descrito su papel como neurohormona y promueve la supervivencia celular a través de la regulación de proteínas anti-apoptóticas tales como: Bax, Bcl-2, fosfatasa 2A; en órganos como corazón y pulmón (Mishra et al., 2006). En la mayoría de las células de los animales existe la maquinaria para convertir la serotonina en melatonina la cual servirá como antioxidante (Zhao et al., 2019). Es la glándula pineal encargada de sintetizar a partir de serotonina, grandes cantidades de melatonina, la cual participa en la regulación de los ciclos luz-oscuridad y estacionalidad reproductiva de los mamíferos mediante la vía N-acetilserotonina (Mohammad-Zadeh et al., 2008).

En los últimos años, se ha llevado a cabo la identificación de receptores serotoninérgicos en el tracto genital del macho y la hembra, lo que ha llevado a investigar su función y participación en estos. Por esto, basado en la experiencia, información y publicaciones que hemos manejado como línea de investigación

generada hace más de 19 años, consideramos que la serotonina y sus componentes pudieran participar en la regulación de las SSC, sus nichos y la espermatogénesis por las razones que a continuación describiremos (Jiménez-Trejo et al., 2012, 2013, 2018, 2021).

1.5.2 LA SEROTONINA EN LA FISIOLÓGÍA REPRODUCTIVA MASCULINA

La espermatogénesis en los mamíferos es regulada principalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (HHG). La producción de espermatozoides es controlada por la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH), que actúan sobre las células de Leydig y de Sertoli respectivamente. Ambas hormonas son producidas en respuesta a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) secretada por el hipotálamo (Oatley & Brinster, 2008). A este respecto, la serotonina participa en la modulación de la secreción de gonadotropinas y en el inicio de la madurez sexual en mamíferos machos, entre otras funciones que revisaremos (Shishkina & Dygalo, 2000)

La serotonina es una de las neurohormonas principales que actúa sobre células neuroendocrinas dispersas a lo largo del tracto urogenital de los mamíferos, incluyendo al testículo, epidídimo y próstata en el ser humano. Ejerce un papel en la contracción de la musculatura urogenital, emisión de fluidos y en el control del eje reproductivo (Pavone et al., 2009; Jiménez-Trejo et al., 2021).

La función más conocida de la serotonina en el testículo es regular el flujo sanguíneo. Sus efectos vasodilatadores se ven predominantemente a nivel arterial. Su acción es mediante la estimulación de los receptores 5-HT₁ y liberación consecuente de óxido nítrico del endotelio vascular (Angoa-Pérez & Kuhn, 2015). Se ha mostrado que la inyección de dosis altas de serotonina intraperitoneal o intratesticular induce atrofia testicular, disminución de la producción de testosterona, conteos reducidos de espermatozoides con motilidad y viabilidad disminuida debido a isquemia parcial en los testículos (Bartlett et al., 1986; Singh et al., 1990). Estudios

en humanos mencionan que la hiperserotoninemia (altas concentraciones de serotonina en suero), induce azoospermia (Gonzales et al., 1989; Jiménez-Trejo et al., 2012).

También, se ha reportado que la serotonina interfiere con las funciones exocrinas y endócrinas del testículo. Por ejemplo, en la rata macho induce un incremento en la síntesis de andrógenos cuando esta disminuye y genera aumento de la concentración espermática, es decir, presenta aparentemente una correlación inversamente proporcional (Kassack, 2002; Jiménez-Trejo et al., 2013; Singh et al., 1990). Además, se ha visto la presencia de serotonina en los espacios intertubulares (intersticio) del testículo de ratas adultas, específicamente en las células de Leydig (Bartlett et al., 1986; Sharpe et al., 1986; Tinajero et al., 1993). Hasta el momento la única región del testículo en la que no se había identificado la presencia de ésta indolamina eran los túbulos seminíferos, sin embargo, recientemente, Jiménez-Trejo et al., (2021), identificaron en algunos linajes celulares la presencia de marcadores del sistema serotoninérgico dentro de los túbulos seminíferos, resultados interesantes ya que la actividad de la enzima de degradación de serotonina, la MAO_A había sido identificada en las paredes de los túbulos seminíferos en ratones neonatos, principalmente (Angoa-Pérez & Kuhn, 2015; Jiménez-Trejo et al., 2021).

La presencia de serotonina en las células de Leydig y no en el lumen de los túbulos seminíferos, sugiere un mecanismo de protección para prevenir el contacto de esta indolamina con las células germinales, sin embargo, los estudios recientes de nuestro grupo de investigación mostraron la presencia de serotonina y de componentes del sistema dentro de los túbulos seminíferos (Jiménez-Trejo et al., 2021), indicando una probable interacción entre las células intersticiales o de Leydig productoras de andrógenos con las células de Sertoli, además, de la interacción que pudiera tener la barrera hemato-testicular, seguramente como factores reguladores de la cuenta espermática. *In vitro* la serotonina inhibe la síntesis de andrógenos, y

aparentemente es un factor determinante en la síntesis y transformación de androstenediona/testosterona en el testículo (Ellis, 1972).

Se ha observado que el contenido intersticial de serotonina y actividad de MAO_A, así como la síntesis de andrógenos aumentan al momento del nacimiento de la rata, coincidiendo con lo que podríamos llamar un “pulso de la mini pubertad” que se presenta en algunos mamíferos como el humano y disminuye al momento en que se da el desarrollo testicular, con un pico máximo al llegar a la madurez sexual (Ruwanpura et al., 2010; Wattanathorn et al., 2018).

La administración de FSH aumenta la actividad de MAO_A, sugiriendo que esta enzima puede estar bajo control de andrógenos o de gonadotropinas (Díaz-Ramos et al., 2018). Otras funciones de la serotonina han mostrado que es un factor promotor del factor liberador de corticotropina (CRF), es decir, un regulador autocrino negativo en la producción de AMPc durante la esteroidogénesis estimulado por la Gonadotropina Coriónica Humana (HCG) en las células de Leydig (Tinajero et al., 1993). La acción de serotonina es mediada por receptores del subtipo 5-HT₂ de alta afinidad y baja afinidad (Dufau et al., 1993).

Se ha mostrado que las células de Leydig y probablemente mastocitos presentan la maquinaria necesaria para la síntesis de novo de serotonina, almacenándola en vesículas secretoras. Estos mastocitos están presentes en la cápsula testicular, lugar donde se conoce reside un alto número de mastocitos y la concentración de serotonina en el líquido intersticial son aún mayores que en la sangre (Frungeri et al., 1999; 2002; Gaytan et al., 1992). En ratas un porcentaje de serotonina testicular proviene del nervio espermático superior y otro porcentaje importante debe ser suplido por las arterias de irrigación (espermática testicular superior; arteria cremastérica). Mientras que otra parte se produce y se almacena en forma de vesículas en las propias células de Leydig generando un sistema intrínseco de serotonina. (Frungeri et al., 1999; Jiménez-Trejo et al., 2013, 2020).

El bloqueo del sistema serotoninérgico con fármacos como la para-cloroanfetamina (PCA), en ratas induce disrupción de la espermatogénesis en la que se pierden principalmente las espermátidas y los espermatoцитos primarios y secundarios, pero, interesantemente, las espermatogonias no se ven afectadas (Aragón et al., 2005). Sin embargo, la acción de la serotonina no se limita al eje HHG, ya que se encuentra presente en los testículos, el epidídimo y en la parte proximal de los conductos deferentes, así como en espermatozoides de humano, ratas y equinos (Frungeri et al., 2002). Por otra parte, Tinajero et al. (1993), Demostraron que la LH es un estímulo para su liberación en las células de Leydig vía dependiente de AMPc por lo que se considera existe un mecanismo autocrino entre la síntesis y regulación por parte de la serotonina hacia la testosterona (T4) en la célula de Leydig, sin embargo, la manera en la que la serotonina regula las funciones testiculares sigue siendo desconocida.

La presencia de MAO_A observada en la cabeza y parte media del espermatozoide indican degradación activa (Jiménez-Trejo et al., 2012). Con toda esta evidencia se sugiere que puede existir una fracción sintetizada, almacenada y probablemente liberada de serotonina en los espermatozoides durante la capacitación espermática en el tracto reproductor de la hembra o que probablemente su presencia local en el tracto genital de la hembra promueva reacciones fisiológicas en los espermatozoides (remoción de glicoproteínas como lectinas durante la capacitación espermática), durante su tránsito.

Por último, vale la pena recordar que un conocimiento más preciso de los mecanismos que involucran el papel de la serotonina en la espermatogénesis y en los espermatozoides durante su maduración en el epidídimo y en los procesos de capacitación en el tracto femenino de mamíferos puede ser útil para el desarrollo de un método anticonceptivo masculino y/o en el tratamiento de la infertilidad a través de métodos de reproducción asistida (fertilización *in vitro*), junto a la importancia que el linaje de células troncales más primitivas en los testículos son requeridas para una adecuada cuenta espermática y su importancia en enfermedades de tipo

cancerígeno, tales como seminoma de células troncales espermatogénicas, de ahí recalcamos la importancia de continuar con esta línea de trabajo para culminar con esta primera tesis.

1.5.3 LA SEROTONINA IMPLICADA EN EL SUPERVIVENCIA DE CELULAS TESTICULARES

Hasta nuestro estudio, no existían datos sobre la participación de la serotonina en la regulación y supervivencia de las SSC, menos aún en SSC tipo As. Como previamente se mencionó, esta neurohormona funge como un regulador muy importante de actividades morfogénicas en la fisiología de los mamíferos incluyendo la neurogénesis en el adulto, la proliferación celular, la migración, la diferenciación y la muerte celular entre otras funciones en diferentes órganos y tejidos (Mohammad-Zadeh et al., 2008). En otros linajes celulares aún existe controversia sobre el efecto que tiene sobre la muerte celular, en SC neuronales promueve la expresión de la proteína Bcl-2 que tiene acción anti-apoptótica (Naoi et al., 2018; Yuksel et al., 2019), mientras que la inhibición de serotonina en células cardíacas provoca la regulación negativa de Bcl-2 e incremento en la muerte de las células por la vía dependiente de caspasas (Rajesh et al., 2006).

Recientemente, se ha observado relación entre la activación de algunos receptores de serotonina (5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}) y la estimulación de la apoptosis por distintas vías de señalización que confluyen en la activación de la caspasa 3 (Meller, 2007; Méndez-Palacios et al., 2016).

Antecedentes sólidos para la realización de este trabajo se basan en los estudios de Syed et al., (1999), quienes mostraron que los espermatoцитos en la fase de paquiteno son capaces de inducir la expresión de uno de los receptores por las células de Sertoli, aunque en este trabajo los autores no describen exactamente qué tipo de receptor 2 es el que se induce (Syed et al., 1999). Además, en ratas viejas en las que se presenta regresión testicular se observa la pérdida de SSC en

el epitelio seminífero, donde existe una regulación negativa de la expresión del ARNm para el receptor de serotonina en las células de Sertoli, estos hallazgos sugieren que pudiera tener un papel fundamental en regular el funcionamiento de las células germinales y la espermatogénesis, así como en el mantenimiento del nicho de SSC en los mamíferos (Syed & Hecht, 2001). Por último, en invertebrados se ha mostrado la participación del sistema serotoninérgico en la maduración de células germinales femeninas, ya que es un inductor natural de la transición G2/M en el ciclo celular de ovogonias de estas especies (Durocher & Guerrier, 1996; Stricker & Smythe, 2001). Se conoce que, dependiendo del receptor activado en células germinales, puede inducir procesos de apoptosis (Chilmonczyk et al., 2017).

En los machos adultos, la apoptosis de SSC durante la espermatogénesis juega un papel muy importante en la producción espermática normal. En los testículos de mamíferos adultos, entre el 25-75% de los espermatozoides potenciales se degeneran y mueren generalmente cuando existe abstinencia. Eventos de apoptosis espontánea se han observado en las espermatogonias, los espermatocitos y las espermátidas de ratas adultas (Dai et al., 2017). Generalmente, se acepta que la apoptosis espermática está bajo control hormonal (LH y FSH). La supresión de gonadotropinas y testosterona promueve la apoptosis en los testículos. Tanto el receptor Fas como la proteína p53 están involucrados en la apoptosis testicular de las SSC (Dai et al., 2017; Sasagawa et al., 2001). Recientemente, con técnicas de autotrasplante de testículos en primates se ha logrado generar “organoides” en los que su histomorfología semeja un testículo con presencia de células parecidas a espermatozoides los cuales *in vitro* y con técnica de ICSI (siglas en inglés), han logrado un desarrollo embrionario y fetal exitoso con crías de la misma especie sanas (Bourdon et al., 2021; Richer et al., 2020).

Otros estudios sugieren que organelos como las mitocondrias son indispensables para la evaluación de la calidad y funcionalidad de células espermáticas (Moraes & Meyers, 2018), esto es debido al hecho de que las mitocondrias contienen su propio

genoma de ADN independiente al del núcleo y pueden generar potenciales de membrana mitocondrial que puede ser fácilmente cuantificados con técnicas *in vitro* para reflejar la integridad del ADN o bien para evaluar la motilidad en células diferenciadas como es el caso de los espermatozoides (Amaral & Ramalho-Santos, 2010; Carra et al., 2004). Debido a que el mantenimiento del potencial de membrana mitocondrial con carga negativa es un requisito previo en las mitocondrias para poder producir ATP y poder mantener un estado energético alto o bajo dependiendo de sus necesidades, este organelo es importante para estudios de su propia actividad a través de sondas fluorescentes indicadoras de su potencial de membrana mitocondrial (Mitotracker; (Gillan et al., 2005)), para evaluar la salud mitocondrial y la calidad celular (Liesa et al., 2009).

1.6 LA ACTIVIDAD MITOCONDRIAL Y SU EFECTO EN LA REPRODUCCION SEXUAL EN MACHOS

El interés en evaluar la actividad mitocondrial deriva de la importancia de las mitocondrias en la producción de ATP, actividad de fosforilación oxidativa y en la participación de la motilidad espermática y durante el proceso de fertilización (O'Connell et al., 2002). Desde hace más de dos décadas se conoce que la actividad mitocondrial puede ser evaluada simultáneamente con marcadores fluorescentes.

El estudio de la actividad mitocondrial en espermatozoides se ha dado como una herramienta de medición para la viabilidad y/o la capacidad de fecundación ya que muchas veces estas muestras de espermatozoides pasan por un estado de criopreservación (Celeghini et al., 2008; Gillan et al., 2005), proceso que puede tener efectos desfavorables en cuanto a la congelación de la parte intermedia del espermatozoide y la ruptura de la membrana por cristales de agua (Figueroa et al., 2016; Peña et al., 2015).

Por otro lado, la disminución de la motilidad puede ser atribuida a la pérdida de la función mitocondrial (O'Connell et al., 2002; Peña et al., 2015) y la ruptura de la membrana mitocondrial puede ser un acontecimiento inicial potenciador de la muerte celular, ya que lleva a la disminución y cese de las funciones primero de la mitocondria y después de todo el aparato interno de los espermatozoides (Celeghini et al., 2008). Sin embargo, la susceptibilidad de las membranas plasmáticas y mitocondrial para la criopreservación puede diferir dependiendo del tipo de crioprotector utilizado (O'Connell et al., 2002). Por lo que, una herramienta utilizada es la citometría de flujo lo que nos permite evaluar y separar células específicas y/o espermatozoides dependiendo de la buena calidad y esto basado en el principio de cuantificar y examinar la integridad de las mitocondrias entre otras pruebas funcionales (i. e. integridad nuclear; Marchetti et al., 2002).

1.7 EL USO DE CITOMETRIA DE FLUJO COMO UNA HERRAMIENTA EN LA FISIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

1.7.1 EL SORTING COMO UN METODO DE AISLAMIENTO DE CELULAS SSC

La citometría de flujo es un método analítico que permite la medición rápida de ciertas características físicas y químicas de células o partículas suspendidas en líquido que producen una señal de forma individual al interferir con una fuente de luz (Adan et al., 2017).

Una de las características analíticas más importantes de los citómetros de flujo es su capacidad de medir múltiples parámetros celulares al mismo tiempo, como el tamaño, forma y complejidad y, por supuesto, cualquier componente celular o función que pueda ser marcada con un fluorocromo (Adan et al., 2017; Ibrahim & van den Engh, 2007). La citometría constituye un complemento valioso de las técnicas clásicas utilizadas para el estudio de la morfología, biología y bioquímica celular. Aunque, desde el punto de vista cronológico, la citometría de flujo es una tecnología relativamente reciente, sus características especiales como una

herramienta para el análisis celular han hecho que en la última década su uso se haya extendido de forma rápida, desde los laboratorios de investigación básica hasta los laboratorios clínicos (González de Buitrago, 2010).

La citometría de flujo representa un método rápido objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión. El principio en el que se basa esta tecnología es simple: hacer pasar células u otras partículas en suspensión alineadas y de una en una por delante de un haz luminoso. La información producida puede agruparse en dos tipos fundamentales: la generada por la dispersión de la luz y la relacionada con la emisión de luz por los fluorocromos presentes en la célula o partícula al ser excitados por el rayo luminoso. Las señales luminosas detectadas se transforman en impulsos eléctricos que se amplifican y se convierten en señales digitales que son procesadas por una computadora (Adan et al., 2017; Ibrahim & van den Engh, 2007).

La separación de células activadas por fluorescencia o *sorting* en un equipo FACS-Calibur (BD Biosciences, CA), permite *In vitro* realizar clasificaciones celulares y existen datos que corroboran su eficiencia en células inmunológicas desde aproximadamente cuatro décadas, pero el uso de estos equipos para el aislamiento de células tipo troncales o Stem cell es relativamente actual. Sin embargo, con el continuo desarrollo de la ciencia y la tecnología, ha hecho que el aislamiento por FACS se haya convertido en una herramienta poderosa para la clasificación y análisis de varios linajes celulares. Los principios básicos de FACS es que a partir de una mezcla heterogénea de células, las de interés son marcadas con anticuerpos fluorescentes altamente específicos y se pasan a través de un sistema láser, mediante el cual, se activan las fluoresceínas, estas emiten una cierta longitud de onda altamente específica que puede ser capturada y agrupada para ser analizadas por un equipo de citometría de flujo y por consiguiente las células con características similares de emisión e interés son separadas. El *sorting* como herramienta se caracteriza por:

1. La recuperación o recovery que es el porcentaje de partículas sorteadas recogidas en el colector del total de las partículas activadas por el equipo de sorting.
2. La pureza: se refiere al porcentaje de partículas sorteadas recogidas que cumplen los criterios seleccionados en función del total sorteado y,
3. El rendimiento que es el porcentaje de partículas recogidas que cumplen los criterios seleccionados en función de las partículas que teóricamente lo cumpliría.

En resumen, el uso de la citometría de flujo para el estudio de las SSC en la medicina veterinaria es relativamente actual, por lo que la optimización de este tipo de técnicas nos podrá ayudar en el aislamiento, procesamiento y manejo de estas células dado que la aplicación de SSC aisladas que hayan sido previamente separadas y cultivadas *in vitro* nos permitirá desarrollar una herramienta terapéutica que pueda dar una solución a patologías como la infertilidad, cáncer testicular y en un futuro garantizar la sobrevivencia de especies en peligro de extinción.

II.JUSTIFICACIÓN

En los últimos años, nuestro grupo de investigación ha estudiado el papel de la serotonina y su funcionamiento en diferentes órganos y tejidos del aparato reproductor masculino de diversos mamíferos mostrando que esta neurohormona está implicada en la funcionalidad de los procesos de maduración espermática y en la motilidad de espermatozoides recién eyaculados, además se logró la caracterización de un sistema local serotoninérgico en los testículos de ratas adultas (Jiménez-Trejo et al., 2007; 2012, 2013, 2015, 2021), lo que nos ha permitido continuar el estudio de la participación de esta indolamina en el tracto reproductor masculino. Sin embargo, pese a todo lo descrito anteriormente, no existen datos que relacionen el efecto que tiene la serotonina y sus componentes en la participación de la viabilidad de las SSC de tipo As y muchos menos en el estado energético que puede conferir la serotonina sobre las mitocondrias en un modelo *in vitro*, por lo que es importante, además, conocer los mecanismos de acción que tiene la serotonina sobre proliferación, viabilidad o diferenciación de las SSC As en el mediano plazo.

III. HIPÓTESIS

La serotonina tiene efectos biológicos sobre las SSC As aisladas de un cultivo primario de células testiculares de rata wistar.

IV. OBJETIVO GENERAL

Caracterizar a las SSC As aisladas de un cultivo primario de células testiculares de rata wistar para establecer la participación que tiene el efecto de la serotonina a nivel de la actividad mitocondrial.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Aislar las células de tipo SSC As de cultivos primarios de testículo de rata wistar con el uso de sorting.
- Caracterizar las SSC aisladas mediante marcadores de pluripotencia CD9, OCT4, c-kit, SOX-2 y AP2 γ con el uso de inmunofluorescencia.
- Identificar marcadores serotoninérgicos en células SSC As como son TPH1, 5-HT, Receptores 5-HT_{1B}, 5-HT_{2A}, 5-HT_{3A}, MAO_A, 5-HT_T y VMAT1.
- Evaluar la función mitocondrial en las SSC As mediante estímulos exógenos de serotonina bajo una curva de dosis-respuesta a tiempos de 5, 10 y 30 min.
- Identificar el mecanismo por lo cual la serotonina aumenta la función mitocondrial.

V. MATERIAL Y METODOS

5.1 SELECCIÓN DE LA POBLACIÓN

El estudio se realizó utilizando como modelo animal ratas recién nacidas (n= 45) de sexo masculino (15 días de edad), de la cepa Wistar, libres de patógenos específicos o SPF (siglas en inglés de Specific Pathogens Free), y contenidas en microaisladores con agua y alimento con la madre hasta ese día de destete, otros animales de edad más adelantada se les suministro alimento a libre acceso. La elección para los estudios justo a la edad de 15 días de nacidos, se originó porque a esa edad se considera una fecha previa al inicio de la espermatogénesis en ratas y bajo la perspectiva a mediano y largo plazo de encaminar estudios en animales y humanos con problemas de infertilidad originados por diversas causas etiológicas y con la finalidad de generar terapias de mantenimiento de SSC en técnicas de cultivo celular para autotransplante y/o exotrasplante, además de aportar conocimientos acerca de la importancia de la serotonina en algunos procesos durante la espermatogénesis. Las ratas de 15 días de edad aun sin destetar estuvieron

localizadas en el Piso 10 de la Torre de Investigación lugar donde se localiza el bioterio y fueron utilizadas en las siguientes etapas del proyecto:

5.2 ETAPA I. OBTENCIÓN DE LOS ÓRGANOS REPRODUCTIVOS DE RATAS WISTAR MACHO

Para la obtención de los órganos reproductivos de la etapa 1, las ratas de 15 días de edad fueron anestesiadas con una dosis de Pentobarbital sódico (40 mg/kg de peso corporal), diluido en solución salina fisiológica (1:1). Previo uso de Xilacina (Rompum®; 2mg/kg peso; Laboratorios Bayer) como relajante muscular. Se incidió el escroto en su línea media y se des-encapsularon, exponiendo los testículos para ligar y cortar el cordón espermático liberando de esta forma los testículos. Los testículos fueron colocados en medio de cultivo celular (ver más adelante). Terminada la extracción de los órganos, los animales fueron anestesiados profundamente con pentobarbital sódico (140 mg / kg de peso) diluido 1:1 con solución salina para cesar las funciones fisiológicas e iniciar inmediatamente el cierre por capas de los tejidos. Los tejidos incididos fueron suturados con ácido poliglicólico (Vicryl 3-0) y sus restos orgánicos se colocaron en bolsas de color específico (bolsa amarilla), para desecho de tejidos o restos animales bien sellada y etiquetada. Los cuerpos se trataron de manera digna y respetuosa. Al finalizar, sus restos se trasladaron al contenedor para cadáveres el cual se localiza en el piso 10 de la Torre de Investigación del INP.

Todo el manejo descrito estuvo contemplado de acuerdo con la Norma Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-1995- SEMARNAT-SSA1-2002 que establece los requisitos para el manejo de los residuos peligrosos biológico-infecciosos (RPBI), que se generan en establecimientos que presten servicios de atención médica. El punto final de los animales se determinó cuando sus funciones fisiológicas de pulso, frecuencia cardíaca y respiratoria cesaron. Es importante mencionar que este proyecto conto con el apoyo de los Proyectos 014/2016 y 046/2019 con aprobación de los Comités de Investigación, de Bioseguridad y CICUAL del INP y el apoyo del Laboratorio de Biología de la Reproducción de la misma Torre de Investigación.

5.3 ETAPA II: AISLAMIENTO CELULAR DE SSC MEDIANTE LA ESTANDARIZACION DEL CULTIVO PRIMARIO DE CELULAS TESTICULARES

Las espermatogonias fueron aisladas a partir de un cultivo primario de células testiculares como se describe (Izadyar, 2002; D. G. Rooij et al., 2002). Después de la eliminación de la túnica albugínea, los testículos se lavaron tres veces en solución salina equilibrada de Hank (HBSS; Life Technologies S.A. Madrid, España), disgregando en una Placa de Petri de 10 cm con micro-tijeras de disección durante 10 minutos y al termino el contenido fue transferido a un tubo de centrifuga cónico de 50 ml con 20 ml de HBSS.

Los tubos fueron incubados a 37°C durante 15 min. El sobrenadante se descartó, y los fragmentos de testículo se lavaron dos veces con HBSS seguido de incubación en una mezcla vol. 1:0.4 de tripsina al 0.25% (Gibco por Life Technologies), a 37 °C por 10 minutos. La tripsina se neutralizó en una proporción 1:2 con el volumen de medio de cultivo: DMEM con Suero fetal bovino (SFB) 10% y el tejido se resuspendió con micropipeta con la finalidad de realizar una disgregación mecánica, al menos 20 veces. Las muestras en suspensión se pasaron a través de un filtro de Falcon™ cat. 352350 de 70µm para eliminar los restos de fragmentos de tejido. Se precipitaron por centrifugación a 1500 rpm por 5 min y se descarto el sobrenadante. Por último, se realizó una estimación de la viabilidad celular mediante tinción con azul tripán (0,4%, p / v) en un microscopio de campo brillante. La suspensión celular se incubo en DMEM-F12 a 37 °C y 5% de CO2 (Herrid et al., 2009; Wu et al., 2011). Las células se cultivaron en DMEM con alto contenido de glucosa (Invitrogen™) suplementado (completo DMEM) con 10% de suero fetal bovino (SFB; Invitrogen™), 1% Glutamax (Invitrogen™) y 1X de Anti-Anti (Invitrogen™).

Las células testiculares permanecieron en suspensión durante 30 minutos y en incubación. Transcurrido este tiempo se tomo de la suspensión celular una alícuota

de 1 ml y se sembró en una caja petri de 35 mm y se le agrego 1.5 ml de medio de cultivo, este cultivo se dejo 24 horas que posteriormente se utilizó como un nicho, cuando se realizó el sorting o separación para obtener las SSC As.

5.4 CARACTERIZACION DE CELULAS CD9⁺ MEDIANTE MARCADORES TRANSMEMBRANALES

Posterior a la obtención del cultivo primario, se preparó una suspensión celular y se centrifugo a 1500 rpm durante 5 minutos posteriormente se re-suspendieron en 100µl de PBS/SFB al 1%. Se incubaron con un anticuerpo CD9 con Alexa Flour 647 (Thermo Fisher SC), además de su isótipo IgG1 con APC (APC es una inmunoglobulina de alofocianina y es un pigmento fotosintético accesorio, tiene seis cromóforos de ficocianobilina por molécula, lo que lo convierte en un fluorocromo brillante que es muy adecuado y altamente específico para aplicaciones de citometría de flujo. La inmunoglobulina APC se seleccionó como un control de isótipo este es utilizado para la detección de fondo bajo en una variedad de células humanas y de roedores (BD Biosciencias, CA; Becton, Dickinson and Company) en diluciones 1:200 y se dejaron incubando por 20 minutos en oscuridad y a una temperatura de 4°C.

Transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS y se centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos para cada uno. Posteriormente se le adiciono el colorante de viabilidad Zombie Violet™ (el cual corresponde a un colorante fluorescente reactivo con aminos que no es permeable para células vivas, pero sí para las células con membranas comprometidas o células “muertas”). Por lo tanto, se utiliza para evaluar el estado de viabilidad celular; proporciona fluorescencia violeta, lo que lo hace adecuado para no interferir con las otras lecturas de nuestros otros fluoróforos; marca: BioLengend) 1:2000 y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. Transcurrido el tiempo se realizaron 3 lavados con PBS/SFB al 1%.

5.5 SEPARACIÓN CELULAR MEDIANTE SORTING

Basados en los principios de la técnica de sorting se realizaron gráficos de dispersión frontal y lateral para excluir ciertos tipos celulares de acuerdo a sus características físicas, como se mencionó en la introducción estas células miden aproximadamente $\sim 20 \mu\text{m}$ por lo que este tipo de instrumento nos permite descartar residuos celulares y agregados de gran tamaño que posiblemente podrían ser células SSC mediante los parámetros de FSC y SSC. Posterior a este análisis se clasificaron por la fluorescencia emitida por la inmunodetección. Las células se clasificaron y se obtuvieron rendimientos de 150,000 células / h aproximadamente y se mantuvo el sorting durante 2 horas en condiciones controladas de temperatura de $36 \text{ }^\circ\text{C}$ y agitación constante. Nuestro mayor rendimiento alcanzó 350,100 células y se recolectaron en tubos de microcentrífuga que contenían medio de cultivo DMEM-F12 y se mantuvieron a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ durante el proceso de separación en FACS.

Después de la separación de CD9^+ , las células se cultivaron en medio DMEM-F12 en condiciones controladas de $37 \text{ }^\circ\text{C}$ y 5% de CO_2 donde permanecieron para su posterior análisis. Cabe señalar que los parámetros de pureza, recuperación y rendimiento fueron obtenidos con ayuda del especialista en Sorting: Carlos Castellanos Barba del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo encargado del equipo FACS Aria.

5.6 PRUEBAS DE IMMUNOFLUORESCENCIA PARA EL SISTEMA SEROTONINERGICO

Las células SSC As CD9^+ se montaron en portaobjetos recubiertos de gelatina y se fijaron en Paraformaldehído (PFA 4%), al 4% disuelto en PBS durante 30 minutos. Para la inmunohistoquímica, la actividad endógena de la peroxidasa se inactivo previamente incubando los portaobjetos en una solución que contenía peróxido de hidrógeno al 0.3%. Después del lavado, las secciones se incubaron con solución de bloqueo (3% de albúmina de suero bovino, 0,3% de Triton X-100 y 0,025% de azida sódica en PB) durante 4 horas a temperatura ambiente. Posteriormente las

muestras se incubaron toda la noche a 4° C con el anticuerpo primario. La información sobre la especificidad y la reactividad cruzada de cada anticuerpo fue proporcionada por los proveedores: **1) anti-5-HT monoclonal de ratón** (5HT; 1: 100, GeneTex, Inc., IRVINE, CA, EE. UU.); **2) anti MAO_A** (H-70; sc-20156; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EE. UU.), Para detectar zonas catabolizadas a 5-HT en testículos; **3) anti TPH** (C-20; sc-15116), **4) anti 5-HT_{1B}** (SR-1B; M-19; sc-1461), **5) anti 5-HT_{2A}** (D-20; sc-32538), **6) anti 5-HT_{3A}** (SR-3A, C-20; sc-19152) **7) 5-HT_T** (ST (N-14; sc-14519), fueron todos anticuerpos policlonales de cabra (Santa Cruz Biotechnology Inc, Santa Cruz , CA, USA). **8) anti GATA-4** (G-4; sc-25310; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), para identificar células de Sertoli (Kyrönlahtia et al., 2011) para los marcadores de pluripotencia: **9) c-Kit**, (E-3; sc-365504; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), **10) SOX2**, (E-4; sc-365823; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA), **11) OCT4** (C-10; sc-5279; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA)y **12) AP2 γ** (6E4/4; sc-12762; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA),

Los anticuerpos se diluyeron en solución de bloqueo. Después de 3 lavados con PBS, las secciones se incubaron dos horas a temperatura ambiente con los anticuerpos secundarios correspondientes acoplados con enzima peroxidasa o fluorocromo (Santa Cruz Biotechnology Inc), diluido 1: 200. En los experimentos de control, los portaobjetos se incubaron con suero preinmune y/o se omitieron los anticuerpos primarios. Los experimentos se realizaron por triplicado (en base al protocolo descrito por Jiménez-Trejo et al., 2021). Las secciones se visualizaron y las imágenes se obtuvieron usando un microscopio Nikon E600 equipado con una cámara digital (Digital Sight DS-5M, Nikon, Melville, NY). Las imágenes se digitalizaron y las figuras se elaboraron con Adobe Photoshop CS5.1 versión 12.1 X64 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, EE. UU).

5.7 DETERMINACION DE LA FUNCION MITOCONDRIAL CON EL USO DE COLORANTES POR CITOMETRIA DE FLUJO

Las células CD9⁺ fueron marcadas con Mitotracker-Red FM [™] (Thermo Fisher, scientific cat. M22425) con las especificaciones del proveedor a una concentración de 200 nM. Posteriormente se separaron 4 grupos:

- Grupo 1: Células CD9⁺ sin mitotracker,
- Grupo 2: Células CD9⁺ tratadas con serotonina,
- Grupo 3: Células CD9⁺ con mitotracker y serotonina
- Grupo control de isotipo APC.

Se dieron tratamientos de serotonina a concentraciones de 1, 10 y 50 μ M para realizar una curva dosis-respuesta y observar la viabilidad de las células después de los estímulos (Meizel & Turner, 1983; Jiménez-Trejo et al., 2012), posteriormente se realizó un ensayo para observar la función mitocondrial en los tiempos 0, 10 y 30 minutos con el estímulo de serotonina.

Los resultados fueron capturados en un equipo para citometría de flujo de tipo Attune Next® en los canales rojo R1 se leyó el CD9⁺ que este acoplado a una fluoresceína de tipo Alexa Flour que absorbe 647 nm, Violeta V1 para el marcador de viabilidad Zombie Violet [™] que absorbe a una longitud de onda de 403 nm, Amarillo Y1 para el Mitotracker ® Red FM que absorbe a una longitud de onda de 581 nm. Así mismo, se construyó un panel multiparamétrico con sus matrices de compensación, en este caso cada fluorocromo se encontraba en canales diferentes por lo que la compensación se realizó como un control analítico de la técnica y no para corregir las absorbancias.

5.8 DETERMINACION DE LA EXPRESION DE PROTEÍNAS FOSFORILADAS DE TIROSINA Y DEL FACTOR LIBERADOR DE CORTICOTROPINA

Para los ensayos de fosforilación de tirosinas utilizamos el anticuerpo: Phosphotyrosine Monoclonal antibody (pY20), acoplado a HRP de Invitrogen (03-7720), y para la expresión del Factor Liberador de Corticotropinas (FLC), fue utilizado el anticuerpo: CRF-BP (G-2; sc-365427; Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA, EUA mouse monoclonal).

Posterior al estímulo de 5-HT, las células se separaron en dos grupos (con y sin estímulo de serotonina), fueron fijadas en una solución de metanol-acetona a concentraciones 2:1 para disminuir la autofluorescencia y el frotis fue realizado también en portaobjetos gelatinizados para evitar su desprendimiento, después de 3 lavados de 5 minutos cada una de las preparaciones fueron colocadas en una solución desenmascaradora de antígenos (citrato de sodio 0.5mM) a temperatura de 55°C aproximadamente durante 20 minutos para desnaturalizar las proteínas. Después de 3 lavados se utilizó suero de bloqueo por 1 hora y se agregó el anticuerpo primario correspondiente a cada marcador durante toda la noche a 4°C (Fosfotirosinas, CREBp o FLC), al siguiente día se lavaron las preparaciones del anticuerpo primario (3 lavados cada uno de 5 minutos), y se colocó el anticuerpo secundario acoplado a fluoróforo o a peróxido de rábano (HRP), esté último para su acoplamiento y amplificación de la señal y poder ser revelado con diaminobencidina en combinación con peróxido de hidrogeno y ser visualizadas las células en campo claro bajo el microscopio óptico. Por otro lado, para las imágenes en fluorescencia se utilizó un microscopio Nikon E600 equipado con una cámara digital (Digital Sight DS-5M, Nikon, Melville, NY). Las imágenes se digitalizaron y las figuras se elaboraron con Adobe Photoshop CS5.1 versión 12.1 X64 (Adobe Systems Incorporated, San José, CA, EE. UU).

VI. RESULTADOS

6.1 IDENTIFICACIÓN Y LOCALIZACIÓN DE CÉLULAS CD9⁺ MEDIANTE CITOMETRIA DE FLUJO.

Como ya se mencionó, se realizaron varias pruebas para estandarizar la edad adecuada en la cual tendríamos un mayor número de SSC As durante el sorting. Se obtuvieron una serie de ensayos con animales (n=5) a diferentes edades: 10, 15 y 25 días post nacimiento como se muestra a continuación. Todos los ensayos partieron de las mismas condiciones desde la obtención de un cultivo primario de células testiculares hasta el análisis de doble inmunomarcaje, uno para CD9⁺ AF y otro para para detectar viabilidad mediante el colorante Zombie Violet (ZV).

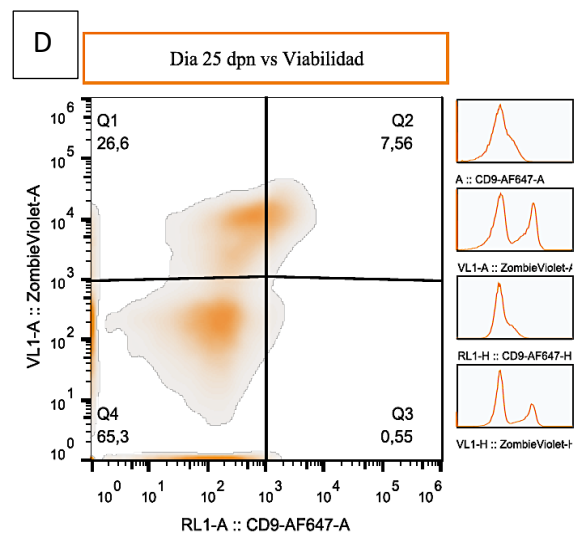
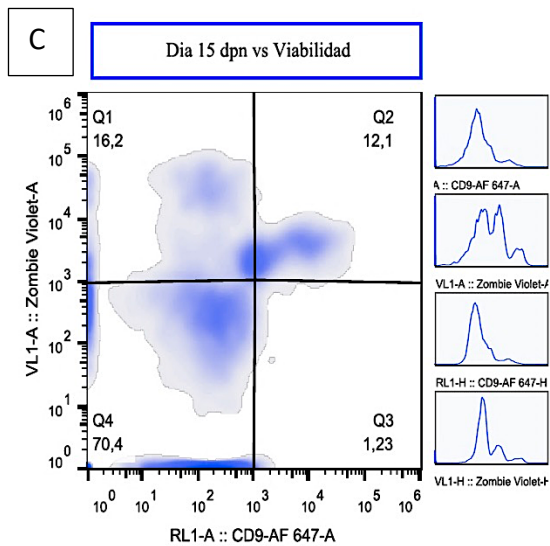
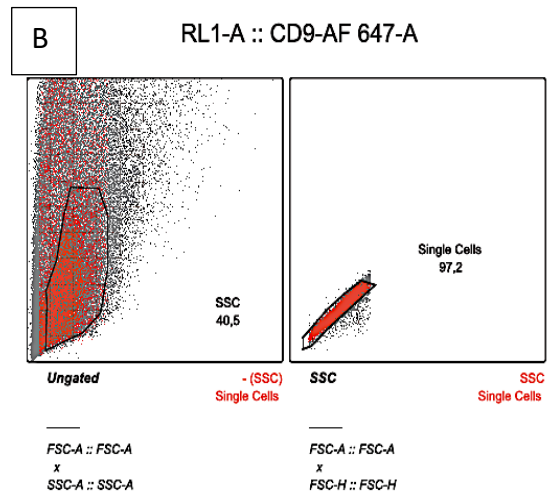
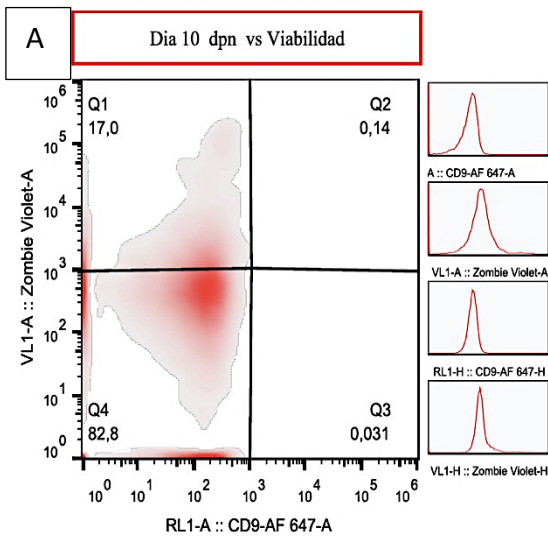


FIGURA 1 Análisis para la población SSC CD9, mediante citometría de flujo. Dot plot para estandarizar la edad de las ratas en la cual se obtuvo mayor número de células CD9+ A) Dot plot para la edad de 10 dpn, en la zona Q2 muestra un 0.14% de SSC As y en color rojo se muestra la población de células testiculares. B) Dot plot que muestra el análisis de la ancestría de la población para la selección de CD9+. C) Dot plot para la edad de 15 dpn, en la zona Q2 muestra un 12.1% de SSC As y en color azul se muestra la población de células testiculares. D) Dot plot para la edad de 25 dpn, en la zona Q2 muestra un 7.56% de SSC As y en color anaranjado se muestra la población de células testiculares. Datos obtenidos en un Attune NXT, CD9 647 nm y ZV 403 nm. Porcentaje obtenido por un total de 2.5 millones de eventos / 2 ml.

De esta manera, se caracterizó la población de interés en donde se observó un mayor número celular de dobles positivas en animales a los 15 dpn como se puede observar en el cuadrante Q2. Además, se realizó el control de Isótipo APC, esto para descartar fluorescencia inespecífica de CD9 en nuestras células. A continuación, se muestran los dot plot que justifican el análisis metodológico seguido para la selección de la edad.

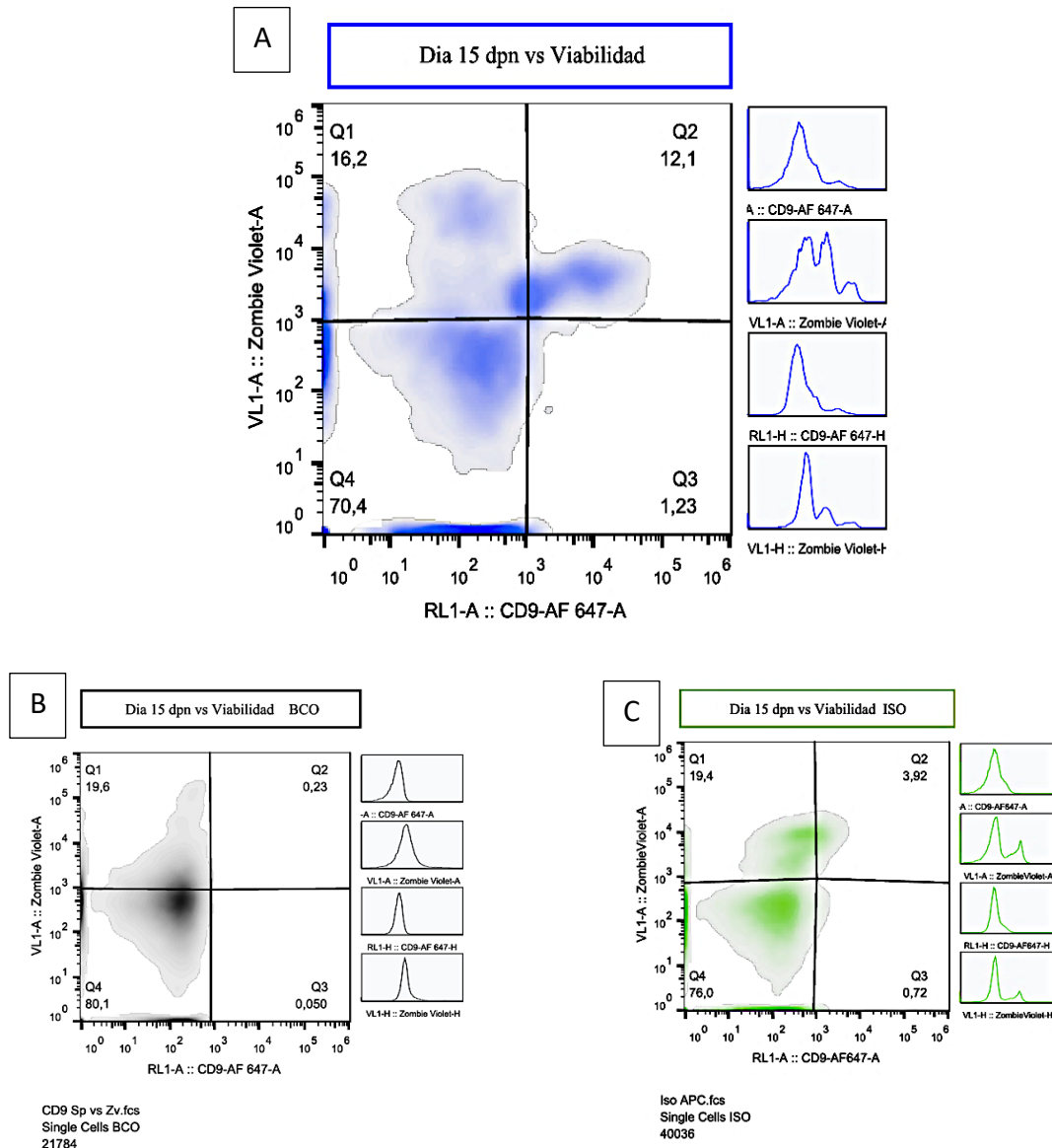


FIGURA 2. Análisis para la población SSC As CD9+, mediante citometría de flujo. Dot plot para 15 dpn. A) Dot plot para las células sin tinción en color negro; se muestra la población de células testiculares. B) Dot plot para la edad de 15 dpn, en la zona Q2 muestra un 12.1% de SSC As y en color azul se muestra la población de células testiculares. C) Dot plot para el control del Isótipo APC a los 15 dpn en la zona Q2 muestra un 3.92% y en color verde se muestra la población de células testiculares. Datos obtenidos en un Attune NXT, CD9 647 nm y ZV 403 nm. Porcentaje obtenido por un total de 2.5 millones de eventos / 2 ml.

6.2 SEPARACIÓN CELULAR DE CD9⁺ MEDIANTE LA TÉCNICA DE SORTING

Se realizó la separación de las células CD9⁺ en el Laboratorio Nacional de Citometría de flujo y se validó la línea con a los parámetros de pureza del equipo FACSARIA y siguiendo los estándares de la calidad de la *NMX-CC-9001-IMNC-2015/ ISO 9001:2015*.

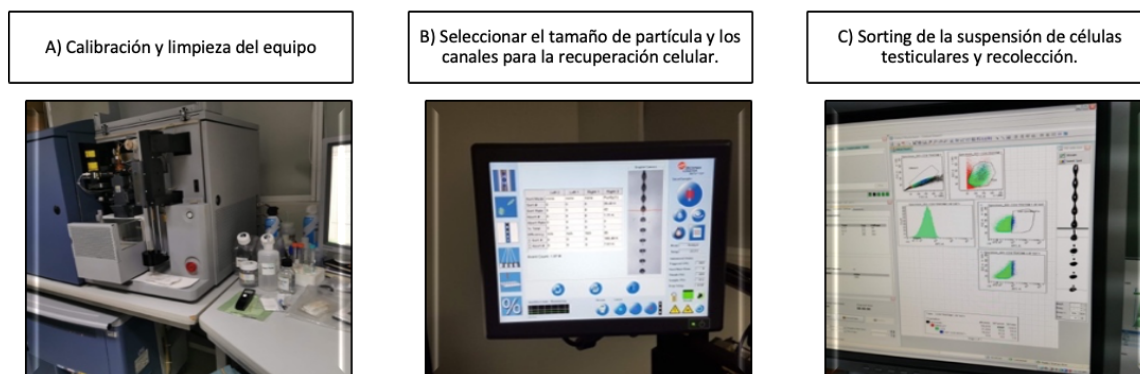


FIGURA 3. Equipos y software de FACSARIA utilizados para el sorting de la población SSC As. A) Foto del Equipo FACSARIA durante la calibración mecánica del equipo. B) Foto de la calibración del software para hacer la determinación del tamaño de partícula y validación del sorting mediante perlas. C) Imagen que muestra en tiempo real la separación de las partículas y comportamiento de la población SSC As.

Se realizaron durante esta investigación seis procesos de sorting como se muestra en la siguiente tabla y se obtuvo un rendimiento aproximadamente del 11 % de SSC CD9⁺ por ensayo.

Fecha	# células testiculares / 2 ml	# de células sorting CD9 ⁺
21 febrero 2019	1.8 millones	200,000
14 marzo 2019	2.2 millones	250,200
28 marzo 2019	2.8 millones	290,400
18 abril 2019	3.1 millones	350,100
16 mayo 2019	3.1 millones	320,200
14 junio 2019	3.0 millones	305,750
Promedio	2.6 millones	286,108
Rendimiento	18.6 millones	11% de SSC

TABLA 1. Muestra de la periodicidad y rendimiento del sorting. En la tabla se muestran las fechas en que realizaron los ensayos de sorting, todos los ensayos se realizaron bajo un control estricto del Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo, con los parámetros que ya se habían estandarizados.

Posterior al sorting CD9⁺ y ZV⁺, se obtuvieron las células SSC As que fueron sembradas en cajas Petri que contenían un co-cultivo de células de Sertoli e incubadas en condiciones DMEM-F12 a 37 °C y 5% de CO₂ (ver figura 4). Este tipo de cultivo le confieren a las SSC ciertos factores de crecimiento como el GNDF que son necesarios para su autorrenovación. Se cultivaron alrededor de 100,00 células por pozo y se mantuvieron en condiciones viables durante 48 horas, posterior a este tiempo se realizaron conteos de 180 – 205 mil células por caja. Dentro de las características morfológicas de las SSC se encuentran, que son células redondas, pequeñas (<25 µm) y con gran cantidad de heterocromatina granular (Hai et al., 2014).

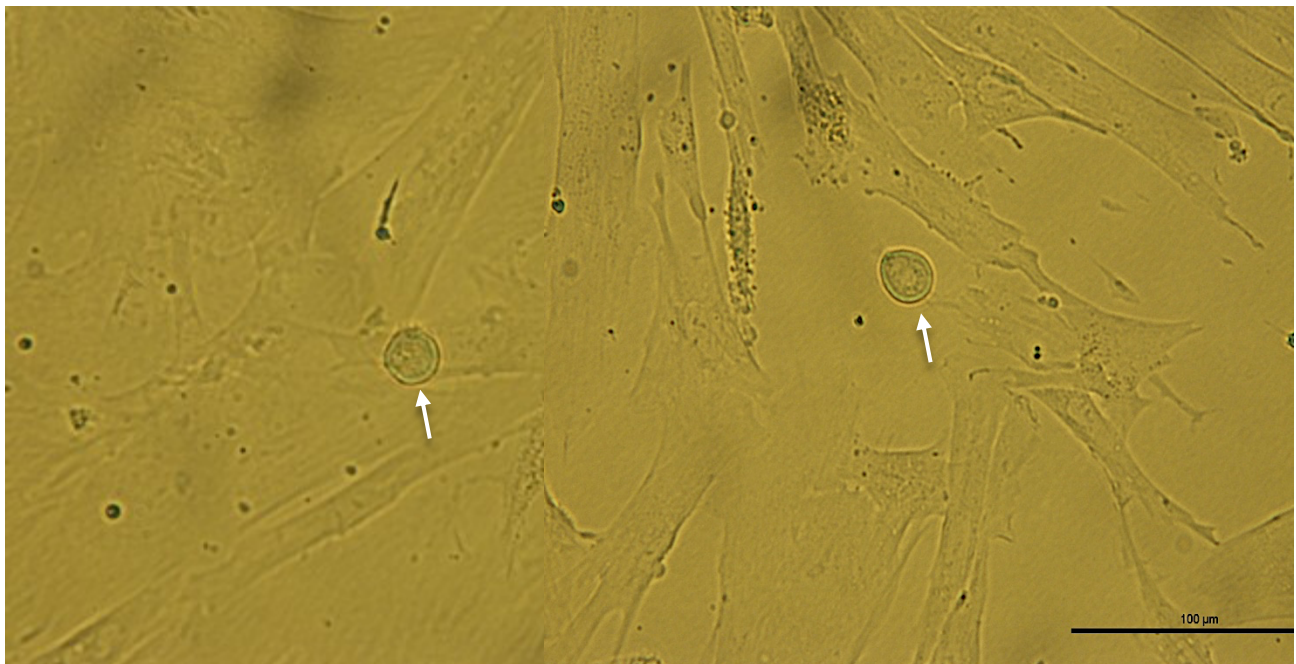


FIGURA 4 Micrografía representativas de los co-cultivos de la población SSC As en campo claro. Se muestra una foto representativa de los co-cultivos a las 48 horas, las flechas señalan células SSC As que se obtuvieron del sorting, estas células no se adhieren al fondo de la caja y se mantienen flotando lo que forma otra de sus características únicas. Escala de 100 µm

6.3 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES DE PLURIPOTENCIA EN CÉLULAS SSC

Se determino la presencia de marcadores de pluripotencia en las SSC As por inmunofluorescencia para OCT4, c-kit, SOX-2 y AP2 γ . Se observa que OCT4 esta expresado en el citoplasma y posiblemente en la membrana plasmática, no se observo fluorescencia en controles negativos (recuadro Figura 5A), confirmando la tinción especifica de OCT4 en células SSC As. De acuerdo con la literatura se sabe que c-Kit está presente en espermátidas redondas y en espermatocitos de etapa tardía, pero no en espermatogonias, nosotros encontramos c-Kit expresado en el citoplasma de la célula (figura 5B). SOX-2 se encuentra expresado en el citoplasma (figura 5C) y al igual que OCT4 son marcadores claves en el desarrollo embrionario. AP2 γ (figura 5D), se encuentra expresado en el núcleo de las SSC As, se ha reportado que este marcador este asociado con el desarrollo temprano en específico con la morfogénesis.

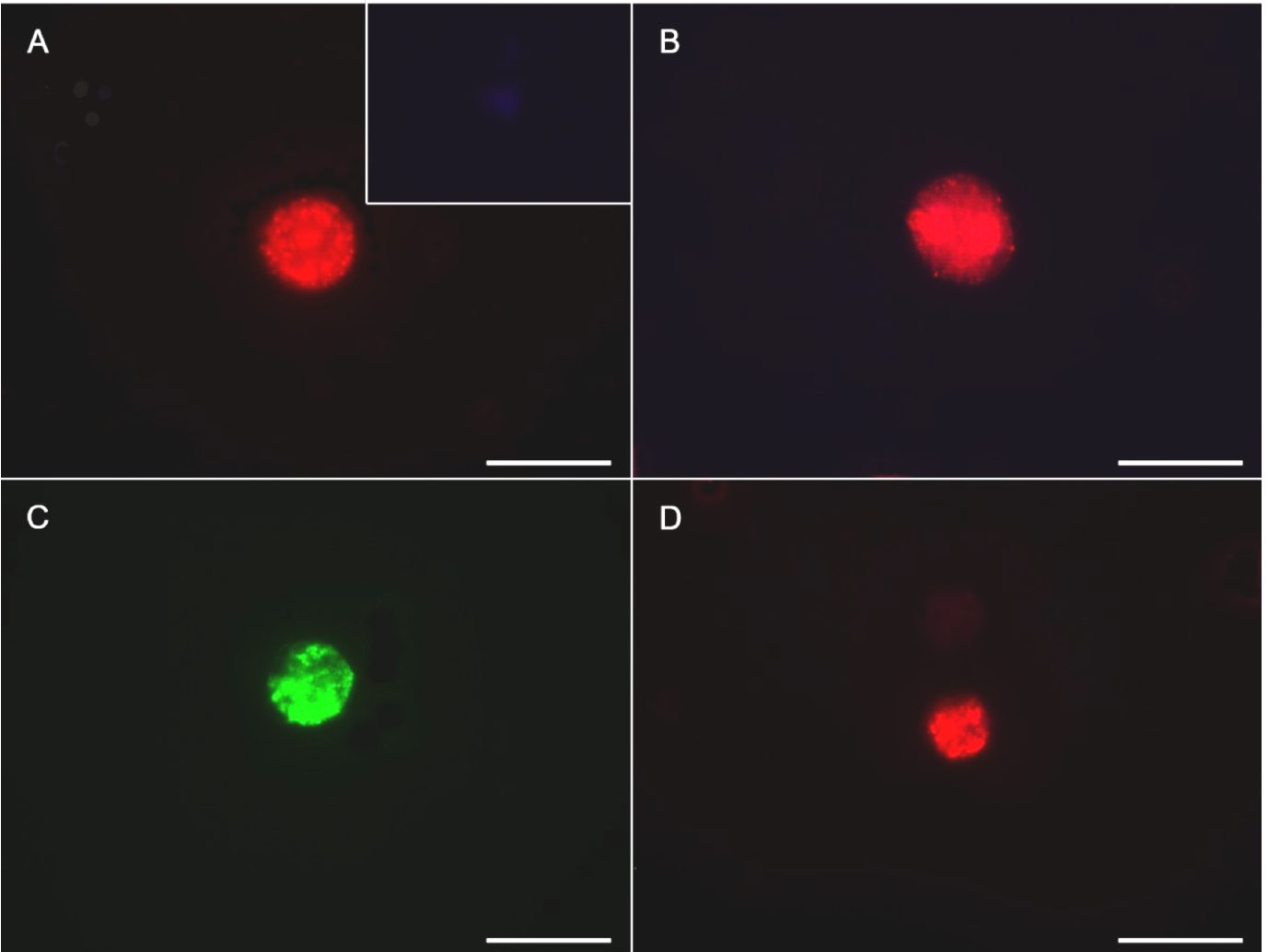


FIGURA 5. Inmunofluorescencia para la expresión de OCT4, c-kit, SOX-2 y AP2 gama en SSC As. A) OCT4 se observa una localización en el citoplasma(rojo), el recuadro representa el control negativo de la técnica; B) c-Kit (rojo) se observa una localización en el núcleo. C) SOX-2 (verde) con una localización en el citoplasma. D) AP2γ(rojo) con localización intranuclear. Escala de barra corresponde a 100X.

6.4 IDENTIFICACIÓN DE MARCADORES SEROTONINÉRGICOS EN CÉLULAS SSC AS

Usando inmunofluorescencia se logró caracterizar algunos marcadores serotoninérgicos que el grupo de investigación anteriormente ya ha reportado en tejidos como testículos, epidídimo y espermatozoides con el uso de un protocolo estandarizado (Jiménez-Trejo et al., 2007; 2012; 2013; 2018; 2021).

La Figura 6 muestra microfotografías para diferentes marcadores serotoninérgicos localizados en SSC As. Figura 6A muestra inmunoreactividad consistente para serotonina en el núcleo celular y citoplasma de 2 células inmunopositivas. En contraste, la enzima limitante de la vía de la síntesis de serotonina periférica: TPH1, se localizó consistentemente de manera polarizada en las células troncales As, la línea punteada en color amarillo, representa el contorno de la célula (Figura 6B). El inserto en la misma figura B muestra una célula control negativo en la que se observa el núcleo teñido con DAPI (azul) sin reacción, corroborando la especificidad de los ensayos. Para el receptor 5-HT_{1B} (Figura 6C), la expresión se observó intensamente dentro del interior celular abarcando el citoplasma y núcleo. El receptor 5-HT_{2A} (Figura 6D), fue observado principalmente en la periferia celular, específicamente en la membrana celular de las troncales. La localización del receptor 5-HT_{3A} (Figura 6E), fue mostrada en forma de gránulos tanto interna como alrededor de la membrana celular. La enzima MAO_A (Figura 6F), mostró localización en el citosol de las células troncales. Para los transportadores de 5-HT; El 5-HT_T se localizó alrededor de la membrana celular y también en el núcleo (Figura 6G). Por último, el transportador de vesículas sinápticas VMAT1, se observó intensamente teñido en el citosol de forma abundante en células SSC As (Figura 6F).

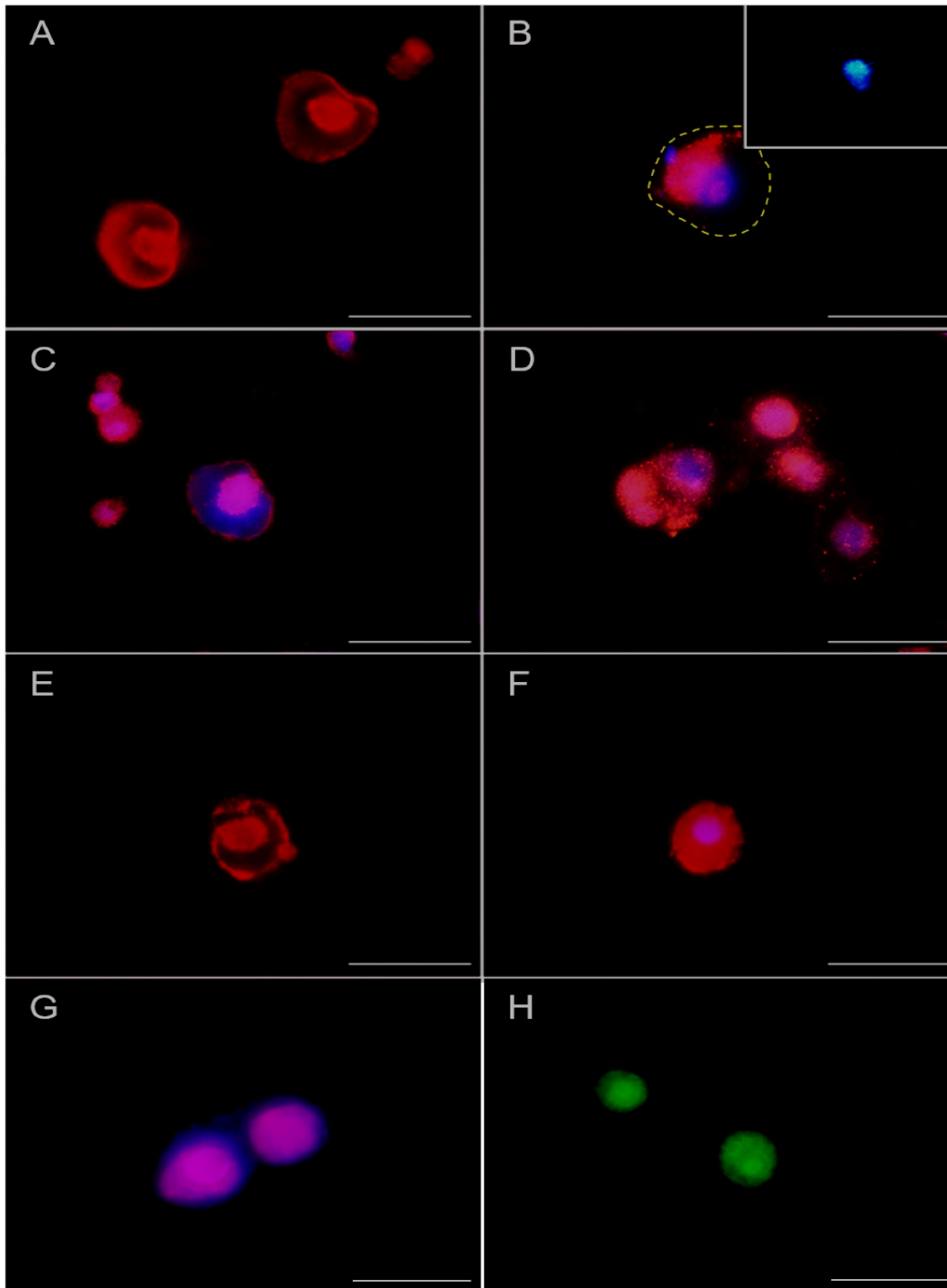


FIGURA 6. Microfotografías que muestran reacción inmunofluorescente para diferentes marcadores serotoninérgicos en SSC As CD9+. A) Se muestra la expresión de 5-HT (rojo) tanto en la membrana como en núcleo de un par de células. B) Para la TPH1, observamos una marca regionalizada de forma consistente en las células. La secuencia de línea amarilla punteada indica el contorno de la membrana celular. El recuadro de la misma figura indica un control negativo de otra célula teñida únicamente con DAPI en la que se observa el contorno del núcleo. C) El receptor 5-HT_{1B}, (rojo) fue observado en zonas del citoplasma y en el núcleo celular. D) El receptor 5-HT_{2A} se observó principalmente alrededor de la membrana celular y en el núcleo. E) el receptor 5-HT_{3A}, fue observado en algunas células como gránulos positivos alrededor de la membrana celular

y en otras células en el interior. F) La enzima MAO_A fue localizada su expresión principalmente en el citoplasma de las células troncales. G) El transportador membranaral 5-HT_T, fue localizado en la membrana celular. H) el transportador vesicular VMAT1 fue localizado dentro del citosol de las SSC As. Escala de barra corresponden a 20 μm de longitud.

6.5 EFECTO DE SEROTONINA EN LA FUNCION MITOCONDRIAL DE SSC

Se logro observar la función mitocondrial en células SSC As aisladas a partir de un marcaje con Mitotracker™ (MT) el cual emite su fluorescencia en 581nm, este colorante se internaliza en las células vivas y genera una fluorescencia basal. En nuestro caso utilizamos este colorante para medir de una manera indirecta la función de las células SSC As cuando reciben un estímulo de serotonina que posteriormente fue detectado por citometría de flujo mediante la intensidad de la fluorescencia. Cabe señalar que este ensayo fue el principio para la estandarización de medir el potencial de actividad mitocondrial en estas células. Se incubaron a diferentes concentraciones de serotonina: 1 μM, 10 μM y 50 μM. Se construyeron gráficas de dosis-respuesta como podemos observar en la figura 7, la expresión de fluorescencia versus (vs), el número de células que reaccionan al estímulo, para obtener la concentración adecuada a la cual teníamos una respuesta sin comprometer la viabilidad de las células.

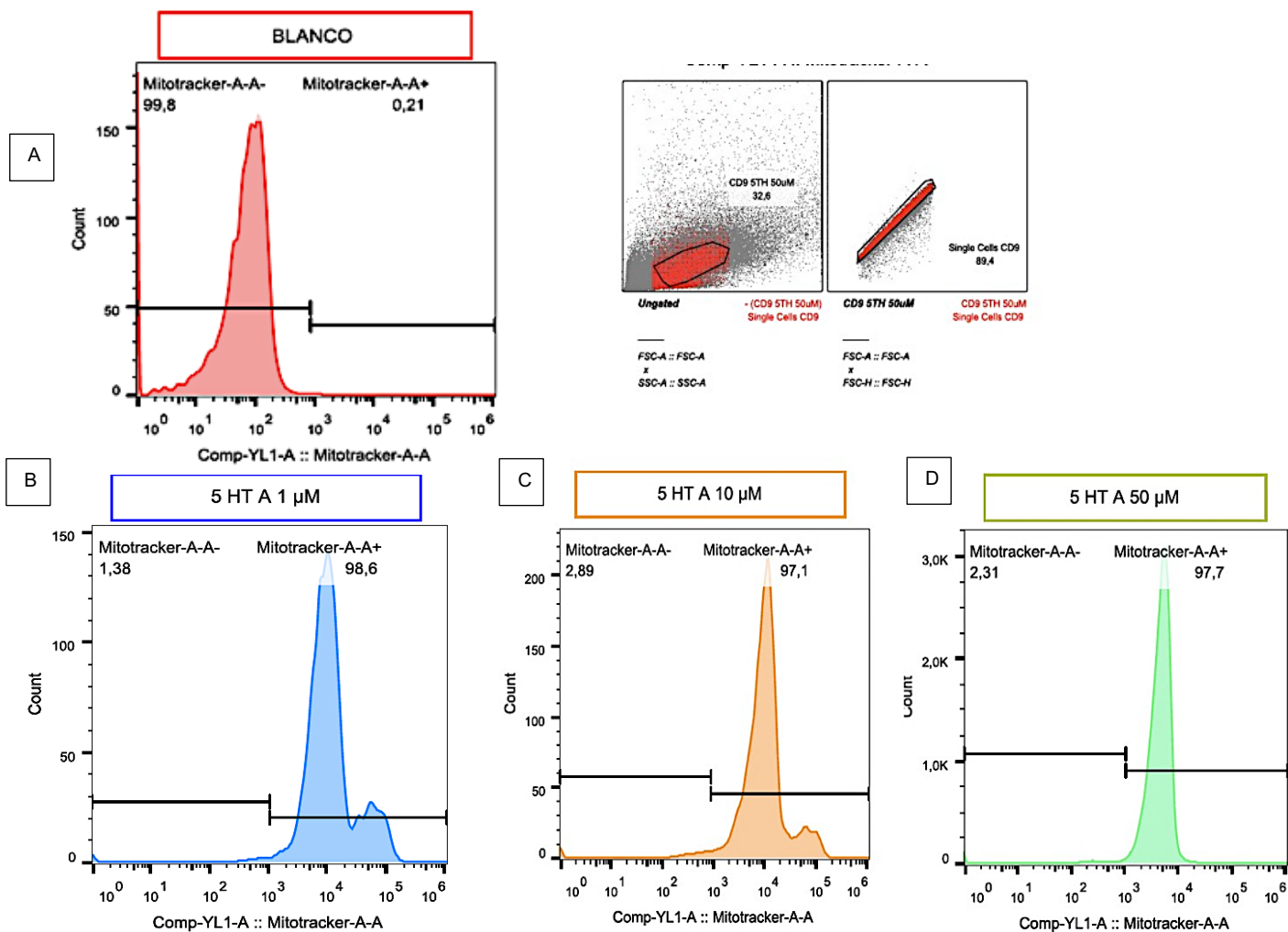


FIGURA 7. Análisis para la población SSC As CD9+, mediante citometría de flujo para la determinación del efecto de serotonina 1, 10 y 15 µM. A) Histograma para las células con Mitotracker (-) vs 50 µM (rojo), donde se observa una respuesta basal de 0.21 y Dot plot para la ancestría para la selección de CD9+ B) Histograma para las células Mitotracker (+) vs 1 µM (azul), donde se observa una respuesta 98.6 C) Histograma para las células Mitotracker (+) vs 10 µM (naranja), donde se observa una respuesta 97.1 D) Histograma para las células Mitotracker (+) vs 50 µM (verde), donde se observa una respuesta 97.7 Datos obtenidos en un Attune NXT, CD9 647 nm y Mitotracker 581 nm. Porcentaje obtenido por un total de 100,000 células / 100 µL.

A concentraciones de 1 y 10 μM existe una respuesta con respecto al blanco, en cuestión a las concentraciones existe un efecto similar ya que el número de células que reaccionan al estímulo con serotonina se encuentra en mismo orden de magnitud, pero a concentración de 50 μM esta respuesta es de mayor incremento 1:10 lo cual indica el efecto en la motilidad en los experimentos realizados por Meizel y Turner (1983) en espermatozoides y Jiménez-Trejo et al., (2012).

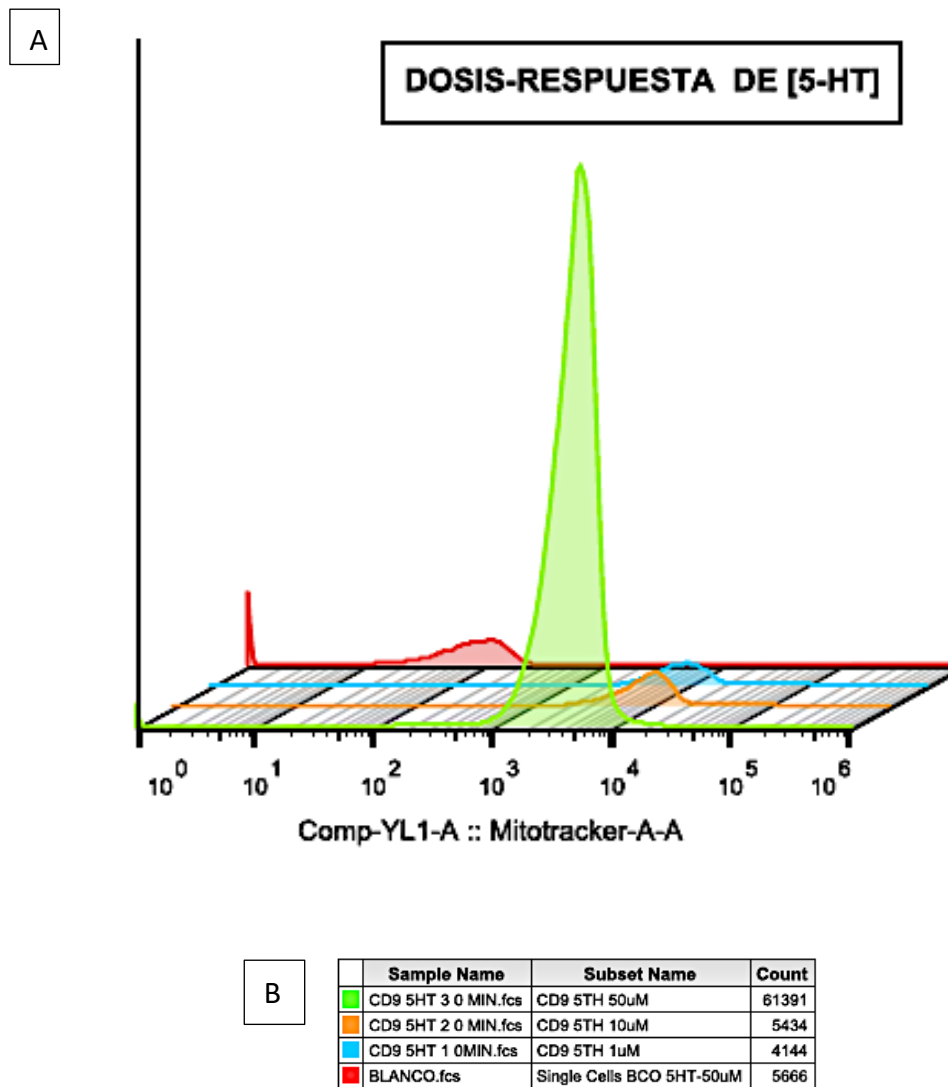


FIGURA 8. Gráfica dosis-respuesta para observar efecto de serotonina 1, 10 y 50 μM . A) Histograma de la comparación de las concentraciones vs el número de células que están reaccionando al estímulo. B) Tabla que muestra la cantidad de eventos en las diferentes concentraciones 50 μM (verde), 10 μM (naranja), 1 μM (azul) y el blanco de la técnica (rojo) Datos obtenidos en un Attune NXT, CD9 647 nm y Mitotraker 581 nm. Porcentaje obtenido por un total de 100,000 células / 100 μL .

Al tener conocimiento sobre la concentración de serotonina a 50 μM con mejor efecto inmediato, también, buscamos observar su efecto en tiempo más prolongado (incubación de 1 minuto, 10 minutos y 30 minutos). Esto nos permitió hacer un análisis para tratar de dilucidar el mecanismo por el cual la serotonina puede generar un efecto al interior de las SSC As y ejercer un mecanismo de su acción por medio de los receptores localizados en las células.

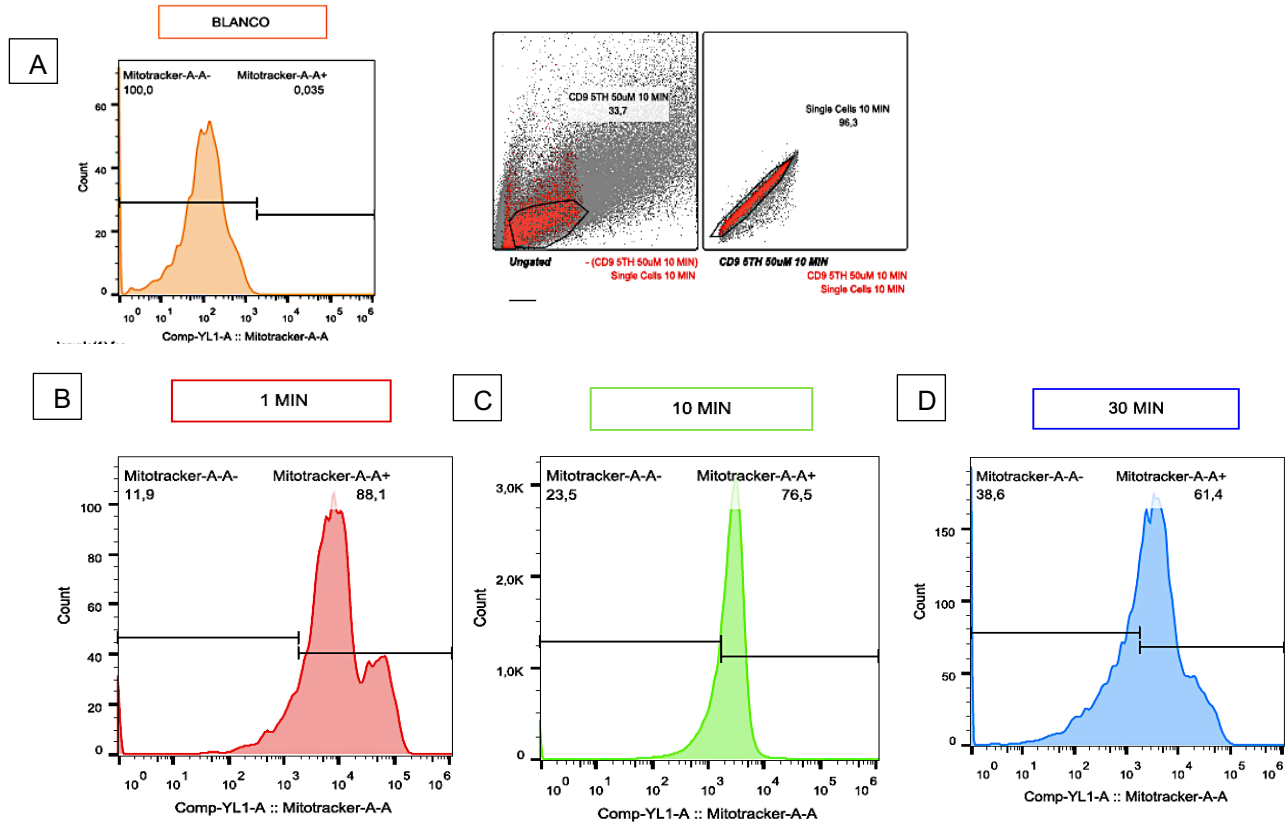


FIGURA 9 Análisis para la población SSC As CD9+, mediante citometría de flujo para la determinación del efecto de serotonina a 50 μM ; 0, 10 y 30 minutos. A) Histograma para las células con Mitotracker (-) vs 50 μM (naranja), donde se observa una respuesta 0.0031 y Dot plot para la ancestría de la población para la selección de CD9+. B) Histograma para las células Mitotracker (+) vs -1 min/50 μM (rojo), donde se observa una respuesta 88.1 C) Histograma para las células Mitotracker (200nM) (+) vs 10 min (verde), donde se observa una respuesta 76.5 D) Histograma para las células Mitotracker (+) vs 30 min (azul), donde se observa una respuesta 61.4; Datos obtenidos en un Attune NXT, CD9 647 nm y Mitotracker 581 nm. Porcentaje obtenido por un total de 100,000 células / 100 μL .

En la figura 9 se muestran los tiempos de incubación obtenidos, resultando que a 10 minutos tenemos mayor respuesta de SSC As al estímulo de 50 μ M durante el tiempo establecido.

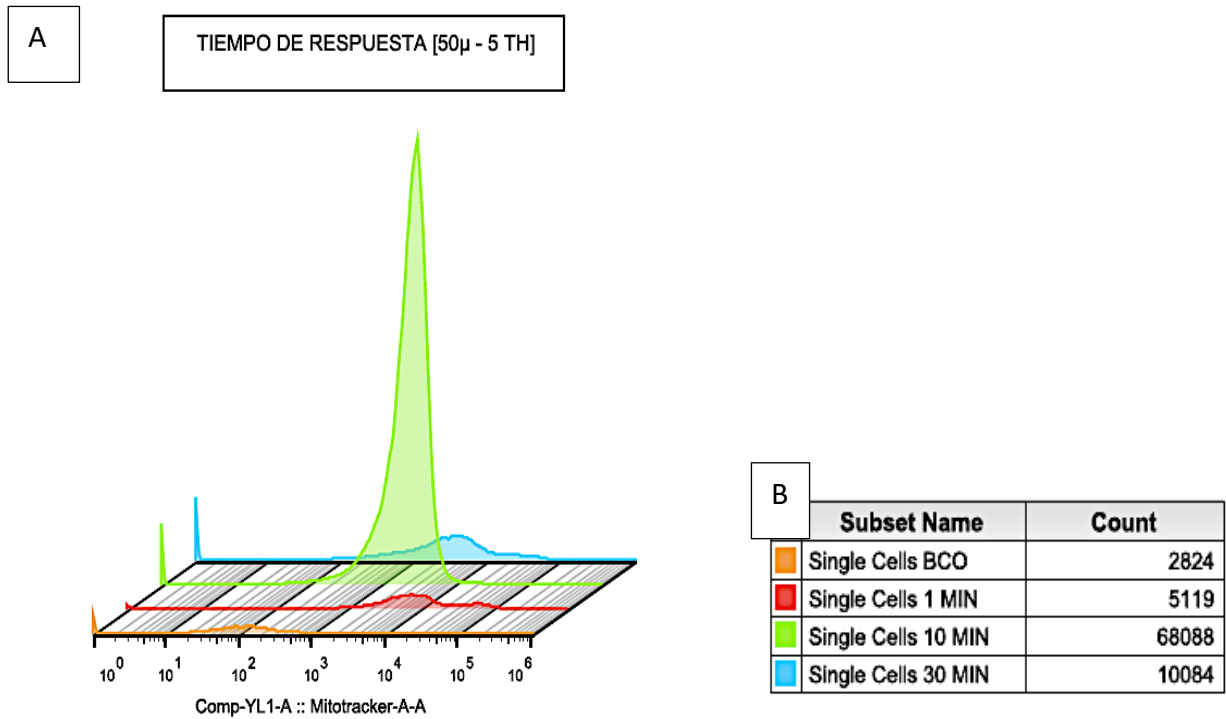


FIGURA 10 Gráfica dosis-respuesta para efecto de serotonina 1, 10 y 30 min. A) Histograma de la comparación de los tiempos de incubación de serotonina 50 μ M vs el número de células que están reaccionando al estímulo. B) Tabla que muestra la cantidad de eventos en los diferentes tiempos células sin tinción (naranja), -1 min (rojo), 10 min (verde) y 30 min (azul). Datos obtenidos en un Attune NXT, CD9 647 nm y Mitotraker 581 nm. Porcentaje obtenido por un total de 100,000 células/100 μ L.

6.6 FOSFORILACIÓN DE PROTEÍNAS DE TIROSINA (PY20)

Utilizando inmunohistoquímica, se realizaron ensayos para mostrar el efecto de la serotonina en células SSC As sobre la fosforilación de tirosinas a concentraciones de 0, 10 y 50 μ M durante 10 minutos (Jiménez-Trejo et al., 2012). La figura 11A muestra una microfotografía panorámica de un grupo de células control sin efecto de serotonina y con su expresión basal para marcador de fosforilación de tirosinas. El recuadro de la misma figura indica un control negativo de la técnica en el que no se observa inmunoreactividad. En B) Se muestra una micrografía en acercamiento de una célula de este grupo en la que se observa el contorno de la expresión para este marcador. C) Se muestra una micrografía panorámica de células SSC As con estímulo de serotonina durante 1 hora, en el que se observa incremento de la inmunoreactividad positiva. D) Acercamiento de una célula SSC As del mismo grupo con estímulo observando incremento de inmunoreactividad positiva para la expresión de fosforilación de tirosinas dentro del citoplasma.

6.7 EXPRESIÓN DE LA SEÑALIZACIÓN DE LA VÍA CREBp Y DEL FACTOR LIBERADOR DE CORTICOPROPINA (FLC).

La figura 12A muestra una microfotografía de una célula control sin estímulo para la inmunoreactividad contra CREBp en fluorescencia, observando una nula expresión para dicho marcador. El inserto en la misma figura muestra el control negativo de la técnica en la que no se observa inmunoreactividad cruzada. La figura 12B muestra una célula con estímulo de serotonina positiva para CREBp en la que la expresión se observa de forma granular dentro de toda la parte interna de la célula. La figura 12C muestra la periferia celular en forma de gránulos de manera basal en una célula control para el marcador del FLC, sin contacto con serotonina *in vitro*. 12D se muestra una célula tratada con serotonina en la que se observa alta expresión específica para el marcador del FLC en forma de gránulos regionalizados en los polos de la célula SSC As.

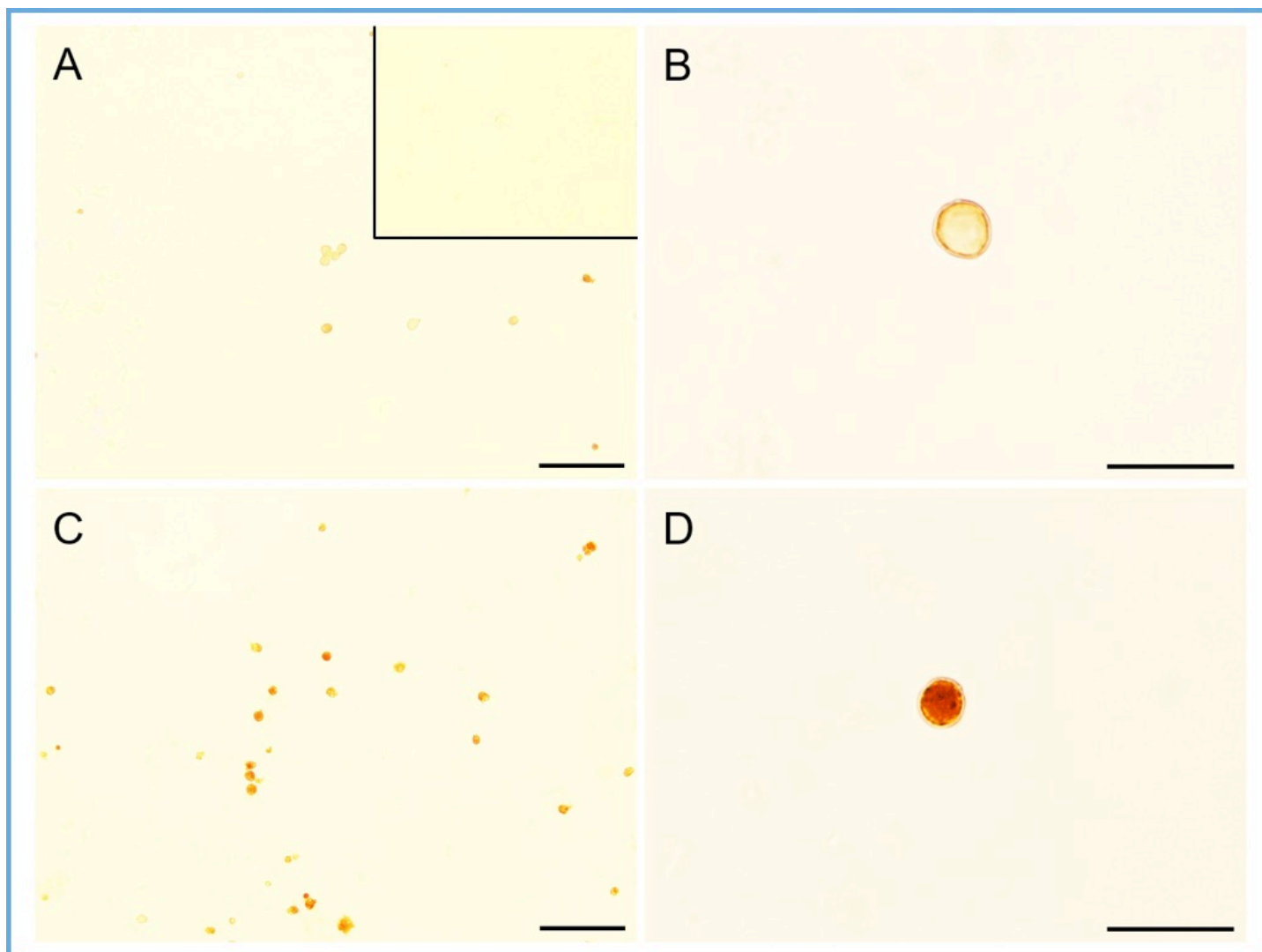


FIGURA 11. Microfotografías de la fosforilación de tirosinas en SSC As CD9+. A) Se muestra una micrografía panorámica de células SSC en campo claro, donde se muestra un grupo de células negativas utilizadas como control para fosforilación de proteínas de tirosinas. El recuadro de la misma figura indica un control negativo de la técnica en el que no se observa inmunoreactividad. B) Acercamiento de una célula SSC As control sin estímulo para serotonina con expresión basal. C) Se muestra micrografía panorámica de células SSC As con estímulo de serotonina durante 1 hora, en el que se observa incremento de la inmunoreactividad positiva. D) Acercamiento de una célula SSC As del mismo grupo con estímulo observando incremento en la fosforilación de tirosinas dentro del citoplasma. Escala de barra corresponden a 20 μm de longitud.

Por otro lado, utilizando inmunofluorescencia se logró caracterizar expresión del factor liberador de corticotropina (CRF) en células SSC As previamente tratadas con 5 HT- 50 μM durante 10 minutos. Esta decisión fue tomada debido a que previamente se ha informado que la serotonina en coordinación con el CRF regulan negativamente la síntesis de testosterona de una manera autocrina a través de receptores 5HT2 (Campos *et al* 1990; tinajero *et al*, 1993)

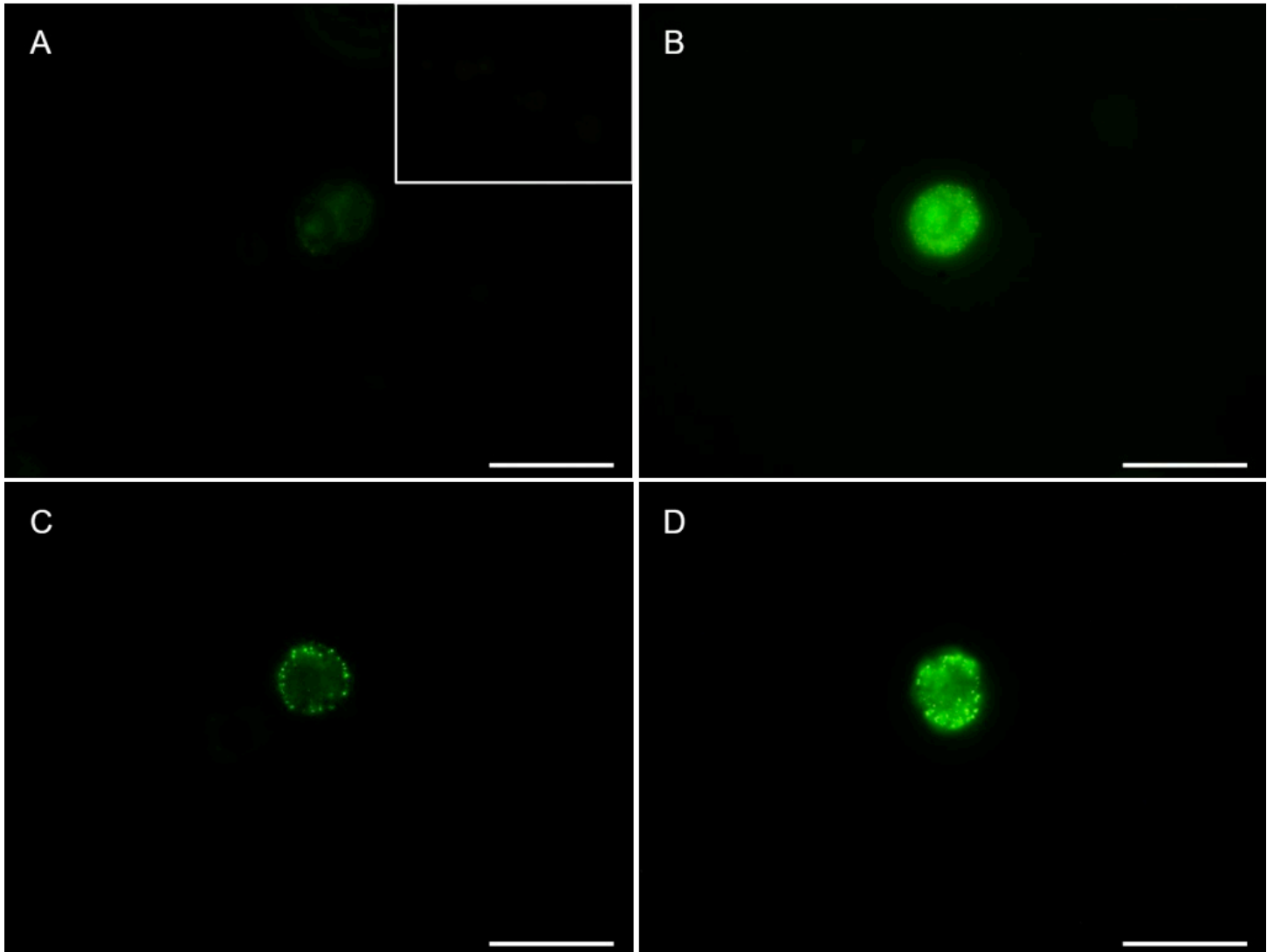


FIGURA 12. Inmunofluorescencia para marcadores CREBp y el factor Liberador de Corticotropina (CRF) en SSC As. A) Se muestra una imagen representativa de SSC As control sin estímulo de serotonina observando una expresión mínima basal de CREBp, Inserto en A corresponde, al control de la técnica. B) muestra imagen representativa de SSC As tratadas con serotonina en la que se observa una célula con alta expresión para la proteína CREBp. C) muestra una célula con expresión basal para el FLC alrededor del contorno celular. D) muestra una célula representativa con estímulo de serotonina en la que se observa expresión incrementada de forma granular aparentemente polarizada. Escala de barra corresponden a 20 μm de longitud.

VII. DISCUSIÓN

Desde su descubrimiento, las células troncales o Stem cell han revolucionado diferentes conceptos e ideas en el campo de la medicina regenerativa y esto es debido a su potencial biológico; se ha visto, que pueden promover nuevas terapias a través de su trasplante que permitan la reparación de tejidos dañados o en proceso de degeneración. Por su amplio potencial terapéutico que representa la tecnología de las SC, se ha logrado utilizar diversos modelos animales que han permitido constituir un excelente sistema *in vitro* para el estudio de trastornos del desarrollo de diversas patologías y/o algunas enfermedades adquiridas.

Es conocido que en reproducción masculina se requieren mayores estudios y esquemas terapéuticos para reactivar la fertilidad tanto en humanos como en animales de alto valor genético, ya que muchas veces, diversas patologías generan infertilidad, así como terapias basadas en radiación o con uso de fármacos agresivos de uso rutinario para quimioterapia de pacientes jóvenes con cáncer principalmente por los efectos secundarios tan radicales que producen terapias de este tipo. Estos últimos conceptos son ahora absorbidos por parte de la medicina emergente llamada Oncofertilidad (humana), dichos preceptos son también aplicables a la medicina reproductiva en animales de alto valor reproductivo y/o genético que pudieran pasar por situaciones para preservar sus gónadas.

Como previamente se mencionó, en modelos animales se ha logrado autotrasplantar, generar y mantener SSC, que muchas veces pueden restaurar la espermatogénesis y la fertilidad a mediano plazo. Dentro del linaje de SSC se tienen a las SSC de tipo As las cuales son las más primitivas e indiferenciadas y son las células protagonistas de este Trabajo de Tesis; estas células se consideran pueden estar implicadas en cáncer de testículo en humanos y animales de alto valor genético ya que se han visto implicadas en seminoma de células germinales.

En cáncer de testículos se conocen cifras en las que se ha considerado que las SSC y/o gonocitos (etapa previa de diferenciación a las As que están presentes durante la gestación), generan entre el 80 y 92 % de cáncer en este órgano.

La importancia fundamental de este linaje celular es llevar su transformación y diferenciación hacia espermatozoides dentro del proceso de espermatogénesis para la reproducción masculina y mantener descendencia en mamíferos incluyendo humanos. En este trabajo se logró estandarizar el aislamiento de SSC As de ratas de 15 días de edad. Las herramientas con que se cuentan en el Laboratorio Nacional de Citometría de Flujo nos permitieron el acceso para el aprendizaje de los equipos y la interpretación de los resultados obtenidos.

De esta forma el aislamiento efectivo permitió dar seguimiento de estas células para poder mostrar y corroborar su linaje con la presencia de marcadores de pluripotencia como lo fueron para C-Kit, OCT4, AP2 γ y SOX2, lo que nos permitió describir junto con las características morfológicas, el perfil de la estirpe troncal de estas células, tal como se ha descrito para stem cell de otros órganos y tejidos (Oatley & Brinster, 2008)

Por otro lado, la serotonina es considerada un neurotransmisor a nivel central y como neurohormona a nivel periférico y conforma una de las moléculas más versátiles y antiguas presentes en todos los organismos vivos, de ahí, la amplia gama de funciones las cuales se deben a su gran familia de receptores que modulan sus acciones.

En Jiménez-Trejo et al (2012) se caracterizó la expresión de algunos marcadores del sistema serotoninérgico presentes en espermatozoides de humano recién eyaculados, así como en otros trabajos en nuestro grupo en los que se reporta expresión de estos mismos marcadores de serotonina en espermatozoides de especies como rata, murciélago, caballo y humano (Jiménez-Trejo et al., 2007, 2012, 2011, 2018, 2021). Sin embargo, no se habían reportado componentes del sistema serotoninérgico en células aisladas “primitivas” SSC As que den origen a

espermatozoides, por lo que consideramos este estudio novedoso y original en su concepción para reportar que por primera vez se reporta en células SSC tipo As marcadores de serotonina como fueron las 2 enzimas responsables de su síntesis (TPH1) y degradación (MAO_A). La presencia de ambas enzimas nos indican que las SSC As pudieran sintetizar intrínsecamente serotonina tal como se sugirió lo pudieran hacer los espermatozoides de humano recién eyaculados en el trabajo reportado en el 2012 por nuestro grupo, así se han detectado en espermatozoides de rata, murciélagos y caballos probablemente derivado de un proceso evolutivo en especies de mamíferos es que su expresión y probablemente su función permanece, manteniendo la idea de síntesis y degradación tal cual como se propuso posterior a la eyaculación durante el proceso de capacitación espermática (hipermotilidad y reacción acrosomal), y durante la fertilización del óvulo, sin embargo, más estudios se requieren para seguir apoyando estas ideas (Jiménez-Trejo et al., 2012; 2018; 2021; (Fujinoki, 2011).

Así mismo, localizamos de manera interesante 3 receptores de serotonina (5-HT_{1B}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{3A}) los cuales son proteínas involucradas en cascadas de señalización celular involucradas en varios procesos neurológicos y biológicos, tales como estado de ánimo, termorregulación, sueño, apetito, etc. a nivel central. Los receptores para serotonina del grupo 5-HT_{1A} se conoce permite la inhibición de la síntesis de AMPc al ser activado en las células que lo expresan (Gaspar et al., 2003); el receptor 5-HT_{2A} que también nosotros describimos en este trabajo se ha descrito que al ser activado en neuronas y otros linajes celulares promueve la generación de inositol trifosfato (inositol 1,4,5-trifosfato o InsP3) y diacilglicerol (DA), los cuales permiten la liberación de calcio desde sus reservas en las células, en este caso probablemente esa misma función sea realizada en las pozas de almacenamiento en los espermatozoides expuestos a serotonina; por otro lado, el receptor 5-HT_{3A} se conoce que forma parte de la subfamilia de receptores tipo canal para la entrada de algunos iones (canal ionotrópico), lo que permite el paso de sodio (Na⁺) y potasio (K⁺), además de permear calcio (Ca²⁺; Lummis, 2012), y sus respuestas de activación por parte de la serotonina dependiendo de su propia

concentración pueden ser inmediatas ya que inician respuestas desde aproximadamente 10 milisegundos en adelante hasta algunos pocos segundos para su acción (Gaspar et al., 2003; Jiménez-Trejo et al., 2012).

Respecto a estos 3 receptores localizados y el ensayo principal que logramos analizar de manera repetible con nuestra curva dosis respuesta de serotonina en las células SSC As, es que logramos observar incremento en el potencial de membrana mitocondrial, el cual puede ser atribuido a este último receptor canal ya que las respuestas generadas fueron favorables desde el inicio del estímulo y un porcentaje alto de células inicio respuesta inmediata, sin embargo, para validar nuestros resultados que fueron siempre consistentes, necesitamos utilizar un ensayo similar con el uso de agonistas y/o antagonistas para corroborar su funcionalidad de cada uno de los receptores encontrados. Mostrar un efecto biológico como indica el título de este trabajo es una labor que el grupo de investigación se ha propuesto corroborar para los siguientes trabajos de investigación y que forman parte de la línea de investigación del laboratorio sede.

Bajo este mismo orden de ideas, existen 2 transportadores que son utilizados por el sistema serotoninérgico, y que también fueron localizados durante este trabajo en estas mismas células. El primero de ellos es un transportador intracelular, localizado en vesículas pequeñas (de centro denso), que se encargan de contener a la serotonina para evitar su biodegradación y el cual permite junto con otro sistema de proteínas unidas a las mismas vesículas que la contienen y bajo un proceso conocido como docking (acoplamiento), la liberación del neurotransmisor por exocitosis en la región de la presinapsis en neuronas. Este transportador intracelular es conocido como VMAT con dos variantes uno central VMAT2 y otro periférico VMAT1 (localizado por nosotros en SSC As), cada uno cumple funciones diferentes en neuronas o en la periferia los cuales son los encargados de conservar a la serotonina para generar una respuesta celular y de alguna manera evitar su degradación dentro del citosol (Fukumoto et al., 2005; Gaspar et al., 2003).

Observar expresión del transportador VMAT1 presente en las SSC As, por nuestro grupo de investigación ya había sido descrito en espermatozoides de humano, rata y caballo, al parecer consideramos pudiera tener como ya se mencionó un componente evolutivo en mamíferos por lo que consideramos que, en este tipo celular su función probablemente sea semejante a lo que se ha reportado en neuronas ya que promueve liberar serotonina expuestas a algún estímulo externo (Gaspar et al., 20003; Jiménez-Trejo et al., 2018).

Por otro lado, el segundo transportador del que hago mención existe como parte del sistema serotoninérgico y es un transportador localizado en las membranas presinápticas (5-HT_T), el cual su principal función es la captura de las moléculas de serotonina para su reciclamiento desde el espacio sináptico o extracelular; este proceso le permite al transportador membranal ingresar a la serotonina para que el VMAT1, en este caso pueda confinar a la serotonina nuevamente dentro de vesículas y evitar su degradación inmediata. De esta forma el serotonina_T regula y termina el efecto continuo que pudiera generar el estímulo de la serotonina en los espacios sinápticos (Gaspar et al., 2003). El hecho de su localización específica en SSC As y saber que previamente ha sido localizado en espermatozoides de diversos mamíferos por nuestro grupo de investigación nos permite confirmar que pueden presentar las SSC As un origen neuroendocrino tal como se propuso anteriormente para los espermatozoides (Jiménez-Trejo et al., 2012), por lo que estas células tan importantes para la reproducción masculina pueden ser consideradas como células neuroendocrinas o paraneuronas (Jiménez-Trejo et al., 2012; Pavone et al., 2009). Este mismo concepto puede ser manejado en estas células ya que, la presencia de la enzima TPH1 y la misma serotonina localizada y contenida en las SSC As nos permite sugerir una probable gama de funciones fundamentales en este linaje troncal como regulador importante de actividades morfogénicas incluyendo proliferación celular, división celular, diferenciación y apoptosis e incluso supervivencia celular y capacidad de metástasis *In vitro*, sin embargo, más experimentos se requieren para confirmar estas ideas.

Así mismo, muchas de las actividades morfogenéticas son reguladas por las mitocondrias en las células que son considerados organelos fundamentales, ya que tienen un papel principal en la bioenergética celular y contribuyen en funciones todavía más especializadas como la trasmisión sináptica, homeostasis de calcio, excitabilidad neuronal y adaptación al estrés, sin contar que contienen su propio ADN (Fanibunda et al., 2019), sin embargo, muchas funciones siguen siendo poco claras por lo que se requiere continuar con estudios dentro de la ahora llamada Serotoninómica (Jiménez-Trejo & Tapia-Rodríguez, 2015). Que ha sido considerada una rama de las ciencias Ómicas que están en auge.

Se conoce que la serotonina a través del receptor 5-HT_{2A} aumenta la biogénesis mitocondrial, reflejada por un incremento en los niveles de ADN mitocondrial lo que da como resultado un aumento en la capacidad respiratoria mitocondrial, eficiencia de fosforilación oxidativa y un aumento en los niveles de ATP, estos efectos generados por la activación del receptor 5-HT_{2A} fueron modulados a su vez por dos participantes del eje de señales como son SIRT1-PGC los cuales se conocen regulan la biogénesis mitocondrial para generar nuevas mitocondrias en las células de acuerdo con sus necesidades celulares y herencia (Fanibunda et al., 2019)

El efecto observado por parte de la serotonina en las SSC As para activar su potencial de membrana mitocondrial nos permite sugerir la participación inmediata del receptor 5-HT_{3A} que es de tipo ionotrópico y probablemente como segunda opción del efecto observado la participación del receptor 5-HT_{2A} (metabotrópico), lo que induce un estado energético más elevado de las células As conforme transcurre el tiempo del estímulo en las células para prepararlas para diferentes efectos dentro de su cascada de señalización como puede ser principalmente la respiración celular, la entrada de calcio para activar el metabolismo interno. Por ejemplo, estrés oxidativo-protección celular y/o para diferenciación y división celular, tal como se ha mostrado en neuronas troncales en modelos de cultivo celular y para propósitos de la línea de investigación se requieren hacer estudios más específicos con agonistas

y/o antagonistas de estos receptores serotoninérgicos para mostrar efectos farmacológicos específicos (Gaspar et al., 2003).

Es importantes recalcar que, resultados alternativos generados en este trabajo fueron obtenidos posterior al estímulo de la serotonina ya que nosotros decidimos fijar las células SSC As para comparar antes y posterior al tratamiento el probable efecto bioquímico observado previamente en espermatozoides en el que la serotonina después de su estímulo genera la activación de proteínas fosforiladas de tirosina tal como se mostró en el trabajo de Jiménez-Trejo et al., (2012), en espermatozoides de humano recién eyaculados en los que se observó que la serotonina incrementa en grado exponencial la expresión de estas proteínas de tirosinas principalmente una con peso molecular aproximado de 97 kDa que se conoce están relacionadas con la hiperactivación de los espermatozoides lo que a su vez se ha postulado activa como respuesta la fosforilación de la proteína Dineína presente en el axonema del flagelo de los espermatozoides lo que les confiere participación en los procesos de hiperactivación durante la capacitación (motilidad asincrónica), reacción acrosomal y fertilidad en espermatozoides de mamíferos.

En este sentido hay autores que señalan que la fosforilación de tirosinas está implicada en la diferenciación celular y funcionalidad de células SSC, señalan que la acción es realizada a través de la señalización de c-Ret tirosina cinasa que se expresa en la espermatogonia indiferenciada A (Naughton et al. 2006) y se requiere para promover la auto- renovación de espermatogonias (Chen & Liu 2015). Por lo que se sugiere que la serotonina podría estar funcionando como un interruptor de apagado y encendido para la diferenciación de SSC.

El hecho de observar variaciones en la expresión de estas tirosinas fosforiladas nos indica que el mismo sistema es activo previo a la diferenciación de los espermatozoides de rata y probablemente en todos los mamíferos para otras funciones que no sean hipermotilidad y reacción acrosomal, en el futuro importante será buscar la función que tiene en este linaje troncal la activación de estas

proteínas fosforiladas de tirosina (Jiménez-Trejo et al., 2012; Meizel & Turner, 1983).

Otro tipo de hallazgo intracelular posterior al estímulo de la serotonina fue el hecho de observar la expresión de la proteína liberadora de corticotropina (PLC), con el uso de anticuerpos específicos para su identificación. Tal como lo observamos con las proteínas fosforiladas de tirosina, para la PLC observamos un incremento en su expresión en las células bajo estímulo de serotonina. Es importante recordar que la PLC está conformada principalmente por un péptido de 41 aminoácidos y que es principalmente secretado por el núcleo paraventricular del hipotálamo y la placenta, sin embargo, en años recientes se ha mostrado su síntesis en otros tipos de células periféricas (Albert & Vahid-Ansari, 2019). En los mamíferos la PLC induce la secreción de la hormona estimulante de la tiroides y dentro de sus funciones generales son regular la respuesta conductual al estrés y está implicada en el control de la secreción pulsátil de la hormona luteinizante (LH) a través de la acción sobre la hormona liberadora de corticotropinas influyendo en funciones reproductivas (síntesis de testosterona, ciclo del epitelio seminífero).

En células aisladas provenientes de diversos tejidos, pero en cultivo celular, también se propone regulan el estado de estrés de las células *in vitro* para su adaptación a condiciones poco usuales activando regiones específicas de genes con capacidad de iniciar síntesis proteica para regular su propia homeostasis (Paschos et al., 2015; Sapolsky, 2000).

En nuestro caso y conociendo la importancia que tienen las SSC As para la espermatogénesis y la reproducción de los animales consideramos que la serotonina al inducir síntesis de FLC genera una alerta en las células para sintetizar otros factores de señalización aún desconocidos por nosotros, a pesar del estrés de por sí “sensado” por las células al ser aisladas bajo condiciones *in vitro*, sin embargo, este primer acercamiento nos puede dirigir al hecho de que la serotonina induce más de una respuesta celular en las SSC As, y que este tipo de respuestas

podrán ser aclaradas con ayuda de técnicas como la optogenética que son recientes en el área de manipulaciones *in vitro*, *in vivo* e *in situ*, que conjugan sondas moleculares generadoras de luz (proteínas modificadas sensibles a la luz), para analizar eventos genéticos y ópticos para observar y controlar eventos específicos en células o tejidos vivos (potencial de membrana, respiración celular). Se ha informado que la serotonina en coordinación con el FLC regula negativamente la síntesis de testosterona de una manera autocrina a través de receptores del grupo 2 (5HT₂; Dufau et al., 1993).

Respecto a la proteína CREBp ('cAMP response element-binding' phosphorylation', por sus siglas en inglés) es una proteína que actúa como factor de transcripción. Se conoce que esta proteína une a ciertas secuencias de ADN llamadas "elementos de respuesta a AMPc", que dependiendo del tipo de elemento podrá incrementar o reducir la transcripción "corriente abajo" (downstream). A este respecto, consideramos que la activación de los receptores de serotonina localizados en las SSC As genes considerados para activar esta proteína permite promover un incremento del metabolismo global de las células As lo que puede permitir que se preparen o condicionen para una diferenciación celular acelerada, sin embargo, esta idea debe ser mostrada también bajo protocolos más específicos y poder corroborar estas novedosas ideas generadas por este trabajo de tesis.

Por último, es importante reconocer que estos resultados son originales ya que hasta el momento no se han descrito efectos que pudiera tener la serotonina en células troncales de testículos de mamíferos (SSC As), por lo que este trabajo que forma parte del grupo de trabajo mencionado, consideramos es relevante para estudios futuros en reproducción animal y humana tanto para apoyar las técnicas de reproducción asistida y/o en la búsqueda de un método anticonceptivo masculino relacionado con el sistema serotoninérgico.

VIII. CONCLUSIONES GENERALES

Se eligió la edad de 15 dpn para realizar el aislamiento de SSC As por sorting con ayuda del anticuerpo CD9+ y se mantuvieron los cultivos celulares por 14 días, posterior a su siembra junto a células de Sertoli, generaron nichos *in vitro* y se corroboró su linaje con la expresión de C-kit+.

De acuerdo con nuestros resultados sugerimos que las células SSC As tienen la capacidad de metabolizar serotonina, ya que existe la expresión de enzimas de su vía como la TPH1 y MAO_A que están implicadas en el procesos anabólicos y catabólicos de la serotonina.

La presencia de sus receptores indica que son activos y funcionales ya que al recibir un estímulo de serotonina de 50 μ M claramente se observa funcionamiento mitocondrial comparada con aquellas células que no recibieron ningún estímulo, esto podría estar asociado por el cambio de la permeabilidad de la célula debido a la entrada de calcio debido a la activación del receptor 5-HT_{3A} al recibir el estímulo de serotonina.

La Serotonina en células SSC As puede estar implicada en procesos de diferenciación celular ya que activa factores de transcripción como CREBp, además de activar cascadas de señalización de segundos mensajeros como AMPc para la activación del proceso de fosforilación de proteínas de tirosinas.

IX. PERSPECTIVAS

Esta línea de investigación permitió corroborar la hipótesis propuesta para la realización de este trabajo por lo que consideramos que el continuar con este mismo tema puede permitir a mediano plazo los siguientes puntos por resolver:

- 1) El uso de agonistas y/o antagonistas nos permitirá conocer directamente el alcance que la respuesta generada por fármacos de estos tipos en las SSC. Así como pueden ser división, apoptosis y/o diferenciación celular.
- 2) Proponer cascadas de señalización por segundos mensajeros inducidos por la serotonina o sus análogos para este linaje celular.
- 3) La búsqueda de métodos de apoyo para técnicas de reproducción asistida para mejorar la espermatogénesis de animales o humanos con problemas de fertilidad.
- 4) Para la búsqueda y exploración del diseño de un método anticonceptivo masculino relacionado con el sistema serotoninérgico.
- 5) Aportar conocimientos generales de las funciones y la relación que tiene la serotonina en la reproducción sexual masculina para que sirva como guía base de fundamentos y nuevos conceptos funcionales.

X. BIBLIOGRAFÍA

- Adan, A., Alizada, G., Kiraz, Y., Baran, Y., & Nalbant, A. (2017). Flow cytometry: basic principles and applications. *Critical Reviews in Biotechnology*, 37(2), 163–176.
- Adayev, T., Ranasinghe, B., & Banerjee, P. (2005). Transmembrane signaling in the brain by serotonin, a key regulator of physiology and emotion. *Bioscience Reports*, 25(5-6), 363–385.
- Albert, P. R., & Vahid-Ansari, F. (2019). The 5-HT1A receptor: Signaling to behavior. *Biochimie*, 161, 34–45.
- Alison, M. R., & Islam, S. (2009). Attributes of adult stem cells. *The Journal of Pathology*, 217(2), 144–160.
- Amaral, A., & Ramalho-Santos, J. (2010). Assessment of mitochondrial potential: implications for the correct monitoring of human sperm function. *International Journal of Andrology*, 33(1), e180–e186.
- Angoa-Pérez, M., & Kuhn, D. M. (2015). Neuroanatomical dichotomy of sexual behaviors in rodents: a special emphasis on brain serotonin. *Behavioural Pharmacology*, 26(6), 595–606.
- Aragón, M. A., Ayala, M. E., Marín, M., Avilés, A., Damián-Matsumura, P., & Domínguez, R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction*, 129(6), 717–727.
- Bartlett, J. M. S., Kerr, J. B., & Sharpe, R. M. (1986). The Effect of Selective

Destruction and Regeneration of Rat Leydig Cells on the Intratesticular Distribution of Testosterone and Morphology of the Seminiferous Epithelium. In *Journal of Andrology* (Vol. 7, Issue 4, pp. 240–253). <https://doi.org/10.1002/j.1939-4640.1986.tb00924.x>

Battler, A., & Leor, J. (2006). *Stem Cell and Gene-Based Therapy: Frontiers in Regenerative Medicine*. Springer Science & Business Media.

Bourdon, G., Cadoret, V., Charpigny, G., Couturier-Tarrade, A., Dalbies-Tran, R., Flores, M.-J., Froment, P., Raliou, M., Reynaud, K., Saint-Dizier, M., & Jouneau, A. (2021). Progress and challenges in developing organoids in farm animal species for the study of reproduction and their applications to reproductive biotechnologies. *Veterinary Research*, 52(1), 42.

Buznikov, G. A., Lambert, H. W., & Lauder, J. M. (2001). Serotonin and serotonin-like substances as regulators of early embryogenesis and morphogenesis. *Cell and Tissue Research*, 305(2), 177–186.

Cannarella, R., Condorelli, R. A., Mongioì, L. M., La Vignera, S., & Calogero, A. E. (2020). Molecular Biology of Spermatogenesis: Novel Targets of Apparently Idiopathic Male Infertility. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(5). <https://doi.org/10.3390/ijms21051728>

Carney, S.-K., Das, S., Blake, D., Farquhar, C., Seif, M. M. W., & Nelson, L. (2012). Assisted hatching on assisted conception (in vitro fertilisation (IVF) and intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 12, CD001894.

Carra, E., Sangiorgi, D., Gattuccio, F., & Rinaldi, A. M. (2004). Male infertility and mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*,

322(1), 333–339.

- Celeghini, E. C. C., de Arruda, R. P., de Andrade, A. F. C., Nascimento, J., Raphael, C. F., & Rodrigues, P. H. M. (2008). Effects that bovine sperm cryopreservation using two different extenders has on sperm membranes and chromatin. *Animal Reproduction Science*, *104*(2-4), 119–131.
- Cheng, C. Y. (2014). Biology of spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, *29*, 1.
- Chen, S.-R., & Liu, Y.-X. (2015). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal and spermatocyte meiosis by Sertoli cell signaling. *Reproduction*, *149*(4), R159–R167.
- Chilmonczyk, Z., Bojarski, A. J., Pilc, A., & Sylte, I. (2017). Serotonin transporter and receptor ligands with antidepressant activity as neuroprotective and proapoptotic agents. *Pharmacological Reports: PR*, *69*(3), 469–478.
- Dai, M. S., Hall, S. J., Vantangoli Policelli, M. M., Boekelheide, K., & Spade, D. J. (2017). Spontaneous testicular atrophy occurs despite normal spermatogonial proliferation in a Tp53 knockout rat. *Andrology*, *5*(6), 1141–1152.
- de Rooij, D. G. (2017). The nature and dynamics of spermatogonial stem cells. *Development*, *144*(17), 3022–3030.
- de Rooij, D. G., & Russell, L. D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, *21*(6), 776–798.
- Díaz-Ramos, J., Flores-Flores, M., Ayala, M. E., & Aragón-Martínez, A. (2018). Impaired serotonin communication during juvenile development in rats diminishes adult sperm quality. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, *64*(5), 340–347.

- Dobрева, M. P., Pereira, P. N. G., Deprest, J., & Zwijsen, A. (2010). On the origin of amniotic stem cells: of mice and men. *The International Journal of Developmental Biology*, *54*(5), 761–777.
- Dufau, M. L., Tinajero, J. C., & Fabbri, A. (1993). Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, *7*(2), 299–307.
- Durocher, Y., & Guerrier, P. (1996). Activation of an 85 kDa ribosomal S6 kinase during serotonin-induced oocyte maturation. *The International Journal of Developmental Biology*, *40*(3), 557–566.
- Ellis, L. C. (1972). Inhibition of rat testicular androgen synthesis in vitro by melatonin and serotonin. *Endocrinology*, *90*(1), 17–28.
- Fanibunda, S. E., Deb, S., Maniyadath, B., Tiwari, P., Ghai, U., Gupta, S., Figueiredo, D., Weisstaub, N., Gingrich, J. A., Vaidya, A. D. B., Kolthur-Seetharam, U., & Vaidya, V. A. (2019). Serotonin regulates mitochondrial biogenesis and function in rodent cortical neurons via the 5-HT receptor and SIRT1-PGC-1 α axis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(22), 11028–11037.
- Fayomi, A. P., & Orwig, K. E. (2018). Spermatogonial stem cells and spermatogenesis in mice, monkeys and men. In *Stem Cell Research* (Vol. 29, pp. 207–214). <https://doi.org/10.1016/j.scr.2018.04.009>
- Figueroa, E., Valdebenito, I., & Farias, J. G. (2016). Technologies used in the study of sperm function in cryopreserved fish spermatozoa. *Aquaculture Research*, *47*(6), 1691–1705.
- Frungieri, M. B., Gonzalez-Calvar, S. I., Rubio, M., Ozu, M., Lustig, L., & Calandra,

- R. S. (1999). Serotonin in golden hamster testes: testicular levels, immunolocalization and role during sexual development and photoperiodic regression-recrudescence transition. *Neuroendocrinology*, 69(4), 299–308.
- Frungieri, M. B., Zitta, K., Pignataro, O. P., Gonzalez-Calvar, S. I., & Calandra, R. S. (2002). Interactions between testicular serotonergic, catecholaminergic, and corticotropin-releasing hormone systems modulating cAMP and testosterone production in the golden hamster. *Neuroendocrinology*, 76(1), 35–46.
- Fujinoki, M. (2011). Serotonin-enhanced hyperactivation of hamster sperm. *Reproduction*, 142(2), 255–266.
- Fukumoto, T., Blakely, R., & Levin, M. (2005). Serotonin transporter function is an early step in left-right patterning in chick and frog embryos. *Developmental Neuroscience*, 27(6), 349–363.
- Gagliardino, J. J., Zieher, L. M., Iturriza, F. C., Hernández, R. E., & Rodríguez, R. R. (1971). Insulin release and glucose changes induced by serotonin. *Hormone and Metabolic Research = Hormon- Und Stoffwechselforschung = Hormones et Metabolisme*, 3(3), 145–150.
- Gaspar, P., Cases, O., & Maroteaux, L. (2003). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews. Neuroscience*, 4(12), 1002–1012.
- Gaytan, F., Aceitero, J., Lucena, C., Aguilar, E., Pinilla, L., Garnelo, P., & Bellido, C. (1992). Simultaneous proliferation and differentiation of mast cells and Leydig cells in the rat testis. Are common regulatory factors involved? *Journal of Andrology*, 13(5), 387–397.
- Gillan, L., Evans, G., & Maxwell, W. M. C. (2005). Flow cytometric evaluation of

- sperm parameters in relation to fertility potential. *Theriogenology*, 63(2), 445–457.
- Gonzales, G. F., Garcia-Hjarles, M. A., Napuri, R., Coyotupa, J., & Guerra-Garcia, R. (1989). Blood serotonin levels and male infertility. *Archives of Andrology*, 22(1), 85–89.
- González de Buitrago, J. M. (2010). Citometría de flujo. In *Técnicas y Métodos de Laboratorio Clínico* (pp. 307–316). Elsevier.
- Hai, Y., Hou, J., Liu, Y., Liu, Y., Yang, H., Li, Z., & He, Z. (2014). The roles and regulation of Sertoli cells in fate determinations of spermatogonial stem cells and spermatogenesis. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 29, 66–75.
- Hess, R. A., & França, L. R. (2005). Structure of the Sertoli Cell. In *Sertoli Cell Biology* (pp. 19–40). <https://doi.org/10.1016/b978-012647751-1/50004-0>
- Hime, G., & Abud, H. (2013). *Transcriptional and Translational Regulation of Stem Cells*. Springer Science & Business Media.
- Honaramooz, A., Cui, X.-S., Kim, N.-H., & Dobrinski, I. (2008). Porcine embryos produced after intracytoplasmic sperm injection using xenogeneic pig sperm from neonatal testis tissue grafted in mice. *Reproduction, Fertility, and Development*, 20(7), 802–807.
- Huckins, C. (1971). The spermatogonial stem cell population in adult rats. I. Their morphology, proliferation and maturation. In *The Anatomical Record* (Vol. 169, Issue 3, pp. 533–557). <https://doi.org/10.1002/ar.1091690306>
- Ibrahim, S. F., & van den Engh, G. (2007). Flow cytometry and cell sorting. *Advances in Biochemical Engineering/biotechnology*, 106, 19–39.
- Ishii, K., Kanatsu-Shinohara, M., Toyokuni, S., & Shinohara, T. (2012). FGF2

- mediates mouse spermatogonial stem cell self-renewal via upregulation of Etv5 and Bcl6b through MAP2K1 activation. In *Development* (Vol. 139, Issue 10, pp. 1734–1743). <https://doi.org/10.1242/dev.076539>
- Ishikawa, H., & Takeshima, H. (1984). An evaluation of blood serotonin in infertile male patients. *Hinyokika Kyo. Acta Urologica Japonica*, 30(9), 1201–1205.
- Izadyar, F. (2002). Isolation and purification of type A spermatogonia from the bovine testis. In *Reproduction* (Vol. 124, Issue 1, pp. 85–94). <https://doi.org/10.1530/reprod/124.1.85>
- Jiménez-Trejo, F., Coronado-Mares, I., Arriaga-Canon, C., Herrera, L. A., Roque-Ramírez, B., Chávez-Saldaña, M., Rojas-Castañeda, J., Cerbón, M., & Viguera-Villaseñor, R. M. (2021). Indolaminergic System in Adult Rat Testes: Evidence for a Local Serotonin System. *Frontiers in Neuroanatomy*, 14, 570058.
- Jiménez-Trejo, F., Coronado-Mares, I., Boeta, M., González-Santoyo, I., Viguera-Villaseñor, R., Arriaga-Canon, C., Herrera, L. A., & Tapia-Rodríguez, M. (2018). Identification of serotonergic system components in stallion sperm. *Histology and Histopathology*, 33(9), 951–958.
- Jiménez-Trejo, F., León-Galván, M. Á., Martínez-Méndez, L. A., Tapia-Rodríguez, M., Mendoza-Rodríguez, C. A., González-Santoyo, I., López-Wilchis, R., Vela-Hinojosa, C., Baranda-Avila, N., & Cerbón, M. (2013). Serotonin in testes of bat *Myotis velifer* during annual reproductive cycle: expression, localization, and content variations. *Journal of Experimental Zoology. Part A, Ecological Genetics and Physiology*, 319(5), 249–258.

Jiménez-Trejo F., Tapia-Rodríguez M. (2015). Exploring the Frontiers of Serotoninomics in Male Reproduction: The Future Ahead. *Single Cell Biology*, 4:3 doi.org/10.4172/2168-9431.1000115

Jiménez-Trejo, F., Tapia-Rodríguez, M., Cerbón, M., Kuhn, D. M., Manjarrez-Gutiérrez, G., Mendoza-Rodríguez, C. A., & Picazo, O. (2012). Evidence of 5-HT components in human sperm: implications for protein tyrosine phosphorylation and the physiology of motility. *Reproduction*, 144(6), 677–685.

Kassack, M. U. (2002). Quantitative comparison of functional screening by measuring intracellular Ca²⁺ with radioligand binding at recombinant human dopamine receptors. *AAPS pharmSci*, 4(4), E31.

Kim, J. H., Jung-Ha, H. S., Lee, H. T., & Chung, K. S. (1997). Development of a positive method for male stem cell-mediated gene transfer in mouse and pig. *Molecular Reproduction and Development*, 46(4), 515–526.

Kinson, G. A., MacDonald, N. E., & Liu, C. C. (1973). The effects of melatonin and serotonin on blood flow fraction and testosterone metabolism in selected organs of the male rat. *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology*, 51(5), 313–318.

Koch, T. G., Berg, L. C., & Betts, D. H. (2008). Concepts for the clinical use of stem cells in equine medicine. *The Canadian Veterinary Journal. La Revue Veterinaire Canadienne*, 49(10), 1009–1017.

Kostereva, N., & Hofmann, M.-C. (2008). Regulation of the spermatogonial stem cell niche. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 43 Suppl 2, 386–392.

Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2003). Spermatogonial stem cells share some, but not all, phenotypic and functional characteristics with other stem

- cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(11), 6487–6492.
- Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2004a). Culture conditions and single growth factors affect fate determination of mouse spermatogonial stem cells. *Biology of Reproduction*, 71(3), 722–731.
- Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2004b). Growth factors essential for self-renewal and expansion of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(47), 16489–16494.
- Kubota, H., & Brinster, R. L. (2018). Spermatogonial stem cells†. In *Biology of Reproduction* (Vol. 99, Issue 1, pp. 52–74). <https://doi.org/10.1093/biolre/iou077>
- Lagos-Cabre, R., & Moreno, R. D. (2008). Mitotic, but not meiotic, oriented cell divisions in rat spermatogenesis. In *Reproduction* (Vol. 135, Issue 4, pp. 471–478). <https://doi.org/10.1530/rep-07-0389>
- Leal, M. C., Cardoso, E. R., Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., Bogerd, J., França, L. R., & Schulz, R. W. (2009). Histological and stereological evaluation of zebrafish (*Danio rerio*) spermatogenesis with an emphasis on spermatogonial generations. *Biology of Reproduction*, 81(1), 177–187.
- Liesa, M., Palacín, M., & Zorzano, A. (2009). Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiological Reviews*, 89(3), 799–845.
- Lin, Y., & Chen, G. (2014). Embryoid body formation from human pluripotent stem cells in chemically defined E8 media. In *StemBook*. Harvard Stem Cell Institute.
- Lin, Y.-N., & Matzuk, M. M. (2014). Genetics of male fertility. *Methods in Molecular Biology*, 1154, 25–37.

- Lummis, S. C. R. (2012). 5-HT(3) receptors. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(48), 40239–40245.
- Marchetti, C., Obert, G., Deffosez, A., Formstecher, P., & Marchetti, P. (2002). Study of mitochondrial membrane potential, reactive oxygen species, DNA fragmentation and cell viability by flow cytometry in human sperm. *Human Reproduction*, 17(5), 1257–1265.
- Marino, E., Fanny, B., Lorenzi, C., Pirovano, A., Franchini, L., Colombo, C., Bramanti, P., & Smeraldi, E. (2010). Genetic bases of comorbidity between mood disorders and migraine: possible role of serotonin transporter gene. *Neurological Sciences: Official Journal of the Italian Neurological Society and of the Italian Society of Clinical Neurophysiology*, 31(3), 387–391.
- Meizel, S., & Turner, K. O. (1983). Stimulation of an exocytotic event, the hamster sperm acrosome reaction, by cis-unsaturated fatty acids. *FEBS Letters*, 161(2), 315–318.
- Meller, E. (2007). 5-HT1A receptor-mediated apoptosis: death by JNK? *Biochimica et Biophysica Acta*, 1773(6), 691–693.
- Méndez Palacios, N., Escobar, M. E. A., Mendoza, M. M., Crispín, R. H., Andrade, O. G., Meléndez, J. H., & Martínez, A. A. (2016). Prepubertal male rats with high rates of germ-cell apoptosis present exacerbated rates of germ-cell apoptosis after serotonin depletion. *Reproduction, Fertility, and Development*, 28(6), 806–814.
- Merchant-Larios H, & Moreno-Mendoza N.(2003). Diferenciación Celular durante el Desarrollo de la Gónada. En *Biología Celular y Molecular*. Luis Felipe Jiménez y Horacio Merchant Larios. Edit. Pearson Education. México. Pp. 713-737.

- Mishra, R. G., Stanczyk, F. Z., Burry, K. A., Oparil, S., Katzenellenbogen, B. S., Nealen, M. L., Katzenellenbogen, J. A., & Hermsmeyer, R. K. (2006). Metabolite ligands of estrogen receptor-beta reduce primate coronary hyperreactivity. *American Journal of Physiology. Heart and Circulatory Physiology*, 290(1), H295–H303.
- Mohammad-Zadeh, L. F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S. M. (2008). Serotonin: a review. *Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics*, 31(3), 187–199.
- Moraes, C. R., & Meyers, S. (2018). The sperm mitochondrion: Organelle of many functions. *Animal Reproduction Science*, 194, 71–80.
- Morrison, S. J., & Spradling, A. C. (2008). Stem cells and niches: mechanisms that promote stem cell maintenance throughout life. *Cell*, 132(4), 598–611.
- Naoi, M., Maruyama, W., & Shamoto-Nagai, M. (2018). Type A monoamine oxidase and serotonin are coordinately involved in depressive disorders: from neurotransmitter imbalance to impaired neurogenesis. *Journal of Neural Transmission*, 125(1), 53–66.
- Naughton, C. K., Jain, S., Strickland, A. M., Gupta, A., & Milbrandt, J. (2006). Glial cell-line derived neurotrophic factor-mediated RET signaling regulates spermatogonial stem cell fate. *Biology of Reproduction*, 74(2), 314–321.
- Nazarian, A., Sun, W. L., Zhou, L., Kemen, L. M., Jenab, S., & Quinones-Jenab, V. (2009). Sex differences in basal and cocaine-induced alterations in PKA and CREB proteins in the nucleus accumbens. *Psychopharmacology* 203 (3): 641-50.
- Nóbrega, R. H., Batlouni, S. R., & França, L. R. (2009). An overview of functional and stereological evaluation of spermatogenesis and germ cell transplantation in fish. *Fish Physiology and Biochemistry*, 35(1), 197–206.

- Oatley, J. M., & Brinster, R. L. (2008). Regulation of spermatogonial stem cell self-renewal in mammals. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 24, 263–286.
- Oatley, J. M., & Griswold, M. D. (2017). *The Biology of Mammalian Spermatogonia*. Springer.
- O'Connell, M., McClure, N., & Lewis, S. E. M. (2002). The effects of cryopreservation on sperm morphology, motility and mitochondrial function. *Human Reproduction*, 17(3), 704–709.
- Orwig, K. E., & Hermann, B. P. (2010). *Male Germline Stem Cells: Developmental and Regenerative Potential*. Springer Science & Business Media.
- Paschos, N. K., Brown, W. E., Eswaramoorthy, R., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2015). Advances in tissue engineering through stem cell-based co-culture. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 9(5), 488–503.
- Pavone, L. M., Tafuri, S., Lo Muto, R., Spina, A., Lychkova, A. E., Mastellone, V., Vittoria, A., Avallone, L., & Staiano, N. (2009). Expression of the serotonin transporter SERT in the genital tract of cattle. *Regulatory Peptides*, 154(1-3), 1–4.
- Peña, F. J., Plaza Davila, M., Ball, B. A., Squires, E. L., Martin Muñoz, P., Ortega Ferrusola, C., & Balao da Silva, C. (2015). The Impact of Reproductive Technologies on Stallion Mitochondrial Function. *Reproduction in Domestic Animals = Zuchthygiene*, 50(4), 529–537.
- Phillips, B. T., Gassei, K., & Orwig, K. E. (2010). Spermatogonial stem cell regulation and spermatogenesis. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1546), 1663–1678.

- Phinney, D. G. (2011). *Adult Stem Cells: Biology and Methods of Analysis*. Springer Science & Business Media.
- Piscaglia, A.-C. (2008). Stem cells, a two-edged sword: risks and potentials of regenerative medicine. *World Journal of Gastroenterology: WJG*, *14*(27), 4273–4279.
- Poongothai, J., Gopenath, T. S., & Manonayaki, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore Medical Journal*, *50*(4), 336–347.
- Pytliak, M., Vargová, V., Mechírová, V., & Felšöci, M. (2011). Serotonin receptors - from molecular biology to clinical applications. *Physiological Research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca*, *60*(1), 15–25.
- Rajesh, K. G., Suzuki, R., Maeda, H., Murio, Y., & Sasaguri, S. (2006). 5-HT₂ receptor blocker sarpogrelate prevents downregulation of antiapoptotic protein Bcl-2 and protects the heart against ischemia-reperfusion injury. *Life Sciences*, *79*(18), 1749–1755.
- Richer, G., Baert, Y., & Goossens, E. (2020). In-vitro spermatogenesis through testis modelling: Toward the generation of testicular organoids. *Andrology*, *8*(4), 879–891.
- Rodrigues, G., & Roelen, B. A. J. (2020). *Concepts and Applications of Stem Cell Biology: A Guide for Students*. Springer Nature.
- Roy, B. (2017). Trend in Publications in Embryonic Stem Cell, Human Embryonic Stem Cell and Induced Pluripotent Stem Cell Research. In *Medical Science* (Vol. 5, Issue 2, p. 32). <https://doi.org/10.29387/ms.2017.5.2.32-33>
- Ruwanpura, S. M., McLachlan, R. I., & Meachem, S. J. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. *The Journal of Endocrinology*, *205*(2), 117–131.

- Ryu, B.-Y., Kubota, H., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2005). Conservation of spermatogonial stem cell self-renewal signaling between mouse and rat. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(40), 14302–14307.
- Ryu, B.-Y., Orwig, K. E., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2003). Stem cell and niche development in the postnatal rat testis. *Developmental Biology*, *263*(2), 253–263.
- Sapolsky, R. M. (2000). Stress hormones: good and bad. *Neurobiology of Disease*, *7*(5), 540–542.
- Sasagawa, I., Yazawa, H., Suzuki, Y., & Nakada, T. (2001). Stress and testicular germ cell apoptosis. *Archives of Andrology*, *47*(3), 211–216.
- Scadden, D., & Srivastava, A. (2012). Advancing Stem Cell Biology toward Stem Cell Therapeutics. In *Cell Stem Cell* (Vol. 10, Issue 2, pp. 149–150). <https://doi.org/10.1016/j.stem.2012.01.010>
- Shishkina, G. T., & Dygalo, N. N. (2000). Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comparative Biochemistry and Physiology. Toxicology & Pharmacology: CBP*, *125*(1), 45–51.
- Siddiqui, E. J., Shabbir, M., Mikhailidis, D. P., Thompson, C. S., & Mumtaz, F. H. (2006). The role of serotonin (5-hydroxytryptamine_{1A} and _{1B}) receptors in prostate cancer cell proliferation. *The Journal of Urology*, *176*(4 Pt 1), 1648–1653.
- Singh, V. B., Onaivi, E. S., Phan, T. H., & Boadle-Biber, M. C. (1990). The increases in rat cortical and midbrain tryptophan hydroxylase activity in response to acute

- or repeated sound stress are blocked by bilateral lesions to the central nucleus of the amygdala. *Brain Research*, 530(1), 49–53.
- Siqueira, R. (2011). Stem cell therapy for retinal diseases: update. In *Stem Cell Research & Therapy* (Vol. 2, Issue 6, p. 50). <https://doi.org/10.1186/scrt91>
- Spinnler, K., Köhn, F. M., Schwarzer, U., & Mayerhofer, A. (2010). Glial cell line-derived neurotrophic factor is constitutively produced by human testicular peritubular cells and may contribute to the spermatogonial stem cell niche in man. *Human Reproduction*, 25(9), 2181–2187.
- Stricker, S. A., & Smythe, T. L. (2001). 5-HT causes an increase in cAMP that stimulates, rather than inhibits, oocyte maturation in marine nemertean worms. *Development*, 128(8), 1415–1427.
- Syed, V., Gomez, E., & Hecht, N. B. (1999). Messenger ribonucleic acids encoding a serotonin receptor and a novel gene are induced in Sertoli cells by a secreted factor(s) from male rat meiotic germ cells. *Endocrinology*, 140(12), 5754–5760.
- Syed, V., & Hecht, N. B. (2001). Selective loss of Sertoli cell and germ cell function leads to a disruption in sertoli cell-germ cell communication during aging in the Brown Norway rat. *Biology of Reproduction*, 64(1), 107–112.
- Tinajero, J. C., Fabbri, A., & Dufau, M. L. (1993). Serotonergic inhibition of rat Leydig cell function by propranolol. *Endocrinology*, 133(1), 257–264.
- Toyooka, Y., Tsunekawa, N., Akasu, R., & Noce, T. (2003). Embryonic stem cells can form germ cells in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(20), 11457–11462.
- Ventelä, S., Mäkelä, J.-A., Kulmala, J., Westermarck, J., & Toppari, J. (2012). Identification and Regulation of a Stage-Specific Stem Cell Niche Enriched by

- Nanog-Positive Spermatogonial Stem Cells in the Mouse Testis. In *STEM CELLS* (Vol. 30, Issue 5, pp. 1008–1020). <https://doi.org/10.1002/stem.1077>
- Walther, D. J., & Bader, M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*, 66(9), 1673–1680.
- Wattanathorn, J., Prabsattroo, T., Somsapt, P., Sriragool, O., Thukham-Mee, W., & Muchimapura, S. (2018). Sexual Enhancing Effect of in Stress-Exposed Rats by Improving Dopaminergic and Testicular Functions. *BioMed Research International*, 2018, 6452965.
- Yuksel, T. N., Yayla, M., Halici, Z., Cadirci, E., Polat, B., & Kose, D. (2019). Protective effect of 5-HT7 receptor activation against glutamate-induced neurotoxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells via antioxidative and antiapoptotic pathways. *Neurotoxicology and Teratology*, 72, 22–28.
- Yu, W., Zheng, H., Lin, W., Tajima, A., Zhang, Y., Zhang, X., Zhang, H., Wu, J., Han, D., Rahman, N. A., Korach, K. S., Gao, G. F., Inoue, I., & Li, X. (2014). Estrogen promotes Leydig cell engulfment by macrophages in male infertility. *The Journal of Clinical Investigation*, 124(6), 2709–2721.
- Zhao, D., Yu, Y., Shen, Y., Liu, Q., Zhao, Z., Sharma, R., & Reiter, R. J. (2019). Melatonin Synthesis and Function: Evolutionary History in Animals and Plants. *Frontiers in Endocrinology*, 10, 249.
- Zwaka, T. P. (2005). A germ cell origin of embryonic stem cells? In *Development* (Vol. 132, Issue 2, pp. 227–233). <https://doi.org/10.1242/dev.01586>