



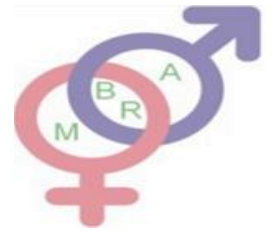
**Casa abierta al tiempo**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

POSGRADO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL



**T E S I S**

**EFFECTO DEL TRATAMIENTO POSTNATAL CON CLOMIPRAMINA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN EL EPIDÍDIMO DE RATAS WISTAR.**

PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

PRESENTA:

B.E. DAVID YOAB ELIZALDE JAIMES

MATRICULA: 2213800850

yoab\_elizalde@hotmail.com

ORCID: 0009-0008-5756-150X

CÓMITE TUTORAL

DIRECTORES:

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ

ASESORA:

DRA. OFELIA LIMÓN MORALES

JURADO:

PRESIDENTA: DRA. OFELIA LIMON MORALES

SECRETARIO: DR. JOEL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

VOCAL: DRA IRMA JIMÉNEZ MORALES

VOCAL: DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA

17 DE MAYO, 2024. IZTAPALAPA, CIUDAD DE MÉXICO

## CARTA DE CONFIDENCIALIDAD

Ciudad de México, a 17 de marzo de 2024

Comisión Académica del Posgrado  
Presente

El que suscribe David Yoab Elizalde Jaime, alumno con número de matrícula 2213800850, del posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa (UAM-I), manifiesto mi compromiso de mantener de forma confidencial y de no utilizar, divulgar o difundir por ningún medio, en beneficio propio o de terceros, la información, la documentación y los datos de toda índole a los que tenga acceso y reciba con motivo del proyecto de investigación "EFECTO DEL TRATAMIENTO POSTNATAL CON CLOMIPRAMINA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN EL EPIDÍDIMO DE RATAS WISTAR." a desarrollar en el laboratorio de Psicobiología Q3-06 de la UAM Iztapalapa. Lo anterior, en términos del artículo 6, fracción V, de los Lineamientos para el Acceso a la Información de la Universidad Autónoma Metropolitana. Esta obligación subsistirá incluso después de haber obtenido el grado.

En caso de que contravenga este compromiso, la Universidad se reserva el derecho de ejercer las acciones civiles y penales que procedan y, en consecuencia, asumo cualquier responsabilidad por el manejo indebido o sin la previa autorización expresa de la UAM-I de la referida información o resultados, así como por los eventuales perjuicios que pudiesen ocasionarse a esta Casa de Estudios.



---

David Yoab Elizalde Jaimes

## DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD

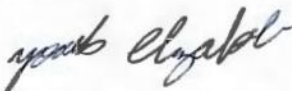
El que suscribe David Yoab Elizalde Jaimes alumno de la Maestría en Biología de la Reproducción Animal, de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud, de la Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa y autor de la tesis o idónea comunicación de resultados titulada "EFECTO DEL TRATAMIENTO POSTNATAL CON CLOMIPRAMINA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN EL EPIDÍDIMO DE RATAS WISTAR".

Declaro que:

1. La tesis o idónea comunicación de resultados que presento ante el H. jurado para la obtención del grado de maestría en Biología de la Reproducción Animal es de mi autoría y original creación, producto del resultado de mi trabajo de investigación personal e individual; el cual cuenta con las correspondientes citas textuales del material bibliográfico utilizado y con el debido otorgamiento de los créditos autorales.
2. En la tesis o idónea comunicación de resultados no he reproducido párrafos completos; ilustraciones, fotografías, diagramas, cuadros y tablas, sin otorgamiento del crédito autoral y fuente correspondiente.
3. En consecuencia, relevo de toda responsabilidad a la Universidad Autónoma Metropolitana de cualquier demanda o reclamación que llegara a formular alguna persona física o moral que se considere con derecho sobre la tesis o idónea comunicación de resultados, respondiendo por la autoría y originalidad de la misma, asumiendo todas las consecuencias económicas y jurídicas si esta no fuese mi creación.

La presente declaración de originalidad se firma en la Ciudad de México el 17 de mayo del 2024.

Atentamente



---

David Yoab Elizalde Jaimes

## **COMITÉ TUTORAL**

### **DRA. HERLINDA BONILLA JAIME**

Área de biología conductual y reproductiva. Depto. De Biología de la Reproducción. UAM-Iztapalapa

### **DR. FAUSTO SÁNCHEZ MUÑOZ**

Subdirección de Investigación Clínica. Depto. de Inmunología. Instituto Nacional de Cardiología Ignacio Chávez

### **DRA. OFELIA LIMÓN MORALES**

Área de biología conductual y reproductiva. Depto. De Biología de la Reproducción. UAM-Iztapalapa

## **JURADO**

**DRA. OFELIA LIMÓN MORALES**

Área de biología conductual y reproductiva.  
Depto. De Biología de la Reproducción.  
UAM-Iztapalapa.

**DR. JOEL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

Cuerpo Académico de Investigación en Quiropráctica.  
Universidad Estatal del Valle de Ecatepec (UNEVE)

**DRA. IRMA JIMÉNEZ MORALES**

Laboratorio de Andrología.  
Depto. de Ciencias de la Salud.  
UAM-Iztapalapa.

**DR. DANIEL ADRIÁN LANDERO HUERTA**

Laboratorio de Biología de la Reproducción.  
Subdirección de Medicina Experimental.  
Instituto Nacional de Pediatría.

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecimientos a la UAM, al CONAHCYT por los apoyos obtenidos (beca del alumno David Yoab Elizalde Jaimes CVU: 1167757; registro de la MBRA ante CONAHCYT 003797), así como al Instituto Nacional de Cardiología “Ignacio Chávez”; al laboratorio de Endocrinología molecular de la Facultad de Química, UNAM; al laboratorio de proteómica. Unidad de Servicios de Apoyo a la Investigación y a la industria (USAI) de la Facultad de química, UNAM; al Instituto Nacional de Psiquiatría “Ramón de la Fuente Muñiz”; al laboratorio de Morfofisiología y bioquímica del espermatozoide de la UAM Iztapalapa, y a todos los colaboradores que permitieron y facilitaron la realización de este proyecto.

Los miembros del jurado designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud, Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, abajo firmantes, aprobaron la tesis titulada “Efecto del tratamiento postnatal con clomipramina sobre la calidad espermática y la expresión de componentes del sistema serotoninérgico en el epidídimo de ratas Wistar” con fecha del 17 de mayo del 2024.

**PRESIDENTE**

**DRA. OFELIA LIMÓN MORALES**

Área de biología conductual y reproductiva.  
Depto. De Biología de la Reproducción.  
UAM-Iztapalapa.



**SECRETARIO**

**DR. JOEL HERNÁNDEZ RODRÍGUEZ**

Cuerpo Académico de Investigación en Quiropráctica.  
Universidad Estatal del Valle de Ecatepec (UNEVE)



**VOCAL**

**DRA. IRMA JIMÉNEZ MORALES**

Laboratorio de Andrología.  
Depto. de Ciencias de la Salud.  
UAM-Iztapalapa.



**VOCAL**

**DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA**

Laboratorio de Biología de la Reproducción.  
Subdirección de Medicina Experimental.  
Instituto Nacional de Pediatría.



## DEDICATORIA

Esta tesis está dedicada en mente, corazón, alma y espíritu a mi mamá, sin su apoyo no hubiera podido lograrlo.

Gracias por darme tu amor, tu lealtad y sobre todo tu amistad. Por estar cerca en todo momento. De hecho, hay una canción de Imagine Dragons que lo explica...

*... "And oh, stupid things I do*

*I'm far from good, it's true*

*Still, I find you*

*Next to me*

*So thank you for taking a chance on me*

*I know it isn't easy*

*But I hope to be worth it" ...*

*Imagine Dragons*

## DEDICATORIAS Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco a la vida, el azar y a las malas decisiones.

A la Dra Linda, por la confianza, la amistad y el apoyo, también por el tiempo, la dedicación y el conocimiento compartido. Por ser una gran persona y generar un ambiente amable de trabajo.

A la Dra. Ofe, por la ayuda, el tiempo, y los reels de gatos. Siempre atesorare los viajes en metro después de comer.

Al Dr. Fausto por las charlas y el café. Gracias por el conocimiento y la pasión por el señor “Bartell”.

A mi familia por ser tan raros, todos han sido una ayuda e inspiración. Sin ustedes no hubiera logrado nada.

Gracias a Doña Solecito, Don Arthur, mis hermanos; Dani y Misael, mis primos; Daniel, Diego e Ismael. Mis tíos Arthur, Jorge, Chavix, Alejandra y Carmen. Y a mi mamá.

También a la familia que me mantiene cuerdo y me “defiende” amorosamente. A mis tíos Rosa y Gabriel, mis primos Jatniel y Ruth. Y a mi papá.

A los amigos que siempre me han apoyado Magaly, Marco, Fernanda, Nakki, y la lista sigue y sigue...

A los amigos y compañeros que conocí durante el transcurso de esta travesía, Yessi, Sarah, Habit, Yenny, Sonia, Alejandra, Lupita y sobre todo a Karly.

A las personas que me brindaron su apoyo durante los experimentos y capacitación, gracias gracias por su paciencia, Dr. Ahiezer, Dr. Ernesto, Dr. Erwin, y Mtro. Mario (al cual considero mi amigo, aunque él no me considere a mi).

Gracias a mi psicólogo, Esteban Rivera, a mi nutrióloga, la Mtra. Yolanda Donaji y coches del gym Cesar y Santiago.

Gracias a mi gatruchita por aparecer cuando más la necesitaba y a Zeus, por ser un dolor de cabeza.

A la música por la inspiración y a todos los grupos y cantantes que hicieron esta tarea más llevadera, Timø, Dvicio, LODV, la poderosísima Karol G, Grupo Firme, Charly USG, Imagine Dragons, Jess y Joy, shye., the score y Rise Against.

**La empatía nos hace humanos,  
pero la indiferencia nos vuelve salvajes.**

# ÍNDICE

<b>RESUMEN</b> .....	<b>14</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>15</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	<b>16</b>
<b>1.1 SEROTONINA</b> .....	<b>17</b>
1.1.1 RECEPTORES SEROTONINÉRGICOS .....	18
1.1.2 TRANSPORTADOR DE 5-HT (SERT) .....	19
<b>1.2 CLOMIPRAMINA</b> .....	<b>20</b>
<b>1.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO</b> .....	<b>22</b>
1.3.1 TESTÍCULO .....	22
1.3.2 EPIDÍDIMO .....	23
1.3.3 DESARROLLO POSTNATAL DEL EPIDÍDIMO .....	26
<b>1.4 5-HT Y EPIDÍDIMO</b> .....	<b>28</b>
<b>1.5 REGULACION DE LA EXPRESION GÉNICA Y CAMBIOS DE LA ACTIVIDAD DEL SERT</b> .....	<b>31</b>
1.5.1 MOLÉCULAS DE RNA NO CODIFICANTE COMO REGULADORAS DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS. ....	32
1.5.2 MIR-16.....	34
1.5.3 MIR-424 .....	36
1.5.4 MIR-34A .....	36
<b>2. ANTECEDENTES</b> .....	<b>38</b>
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b> .....	<b>39</b>
<b>4. OBJETIVO GENERAL</b> .....	<b>41</b>
<b>5. OBJETIVOS PARTICULARES</b> .....	<b>41</b>
<b>6. HIPÓTESIS</b> .....	<b>41</b>
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b> .....	<b>42</b>
<b>7.1. EVALUACIÓN DE LOS PARÁMETROS DE CALIDAD ESPERMÁTICA</b> .....	<b>43</b>
<b>7.2. DETERMINACIÓN DE LA EXPRESIÓN PARA EL RECEPTOR 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, EL SERT Y MAO.</b> .....	<b>45</b>
<b>7.3. DETECCIÓN DE MIRNAS</b> .....	<b>46</b>
<b>7.4 CUANTIFICACIÓN DE 5-HT EN EPIDÍDIMO</b> .....	<b>47</b>
<b>7.5 ANÁLISIS ESTADÍSTICO</b> .....	<b>48</b>

<b>8. RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>8.1 CALIDAD ESPERMÁTICA .....</b>	<b>49</b>
<b>8.2 EXPRESIÓN GÉNICA. ....</b>	<b>51</b>
<b>8.3 CONCENTRACIÓN DE 5-HT.....</b>	<b>55</b>
<b>9. DISCUSIÓN.....</b>	<b>56</b>
<b>10. CONCLUSIONES.....</b>	<b>65</b>
<b>11. BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>66</b>

## RESUMEN

La clomipramina (CMI) es un fármaco utilizado en la medicina como opción para el tratamiento de diversas patologías relacionadas con la actividad de la serotonina (5-HT), como lo es el caso de la depresión. La CMI inhibe la recaptura de 5-HT y, por lo tanto, sus efectos no son solamente a nivel de sistema nervioso central, sino que también altera la función del sistema serotoninérgico en otros órganos, por ejemplo, los reproductivos como los son el testículo y el epidídimo, ya que estos dependen de la 5-HT para realizar movimientos musculares en el transporte de los espermatozoides, cambios de los microambientes de las regiones del epidídimo, así como, para la adquisición de motilidad espermática. Se ha reportado que la CMI tiene un efecto espermicida y que altera la calidad espermática. La administración de este fármaco en una ventana de tiempo crítico para la diferenciación y desarrollo de estos órganos podría causar alteraciones en la etapa adulta que se reflejan en la función reproductiva, provocando efectos secundarios irreversibles. En este trabajo se evaluaron los efectos de la administración de CMI (30 mg/kg) en el periodo de los días postnatales (DPN) del 8 al 21 evaluando la calidad espermática, los componentes del sistema serotoninérgico y reguladores postranscripcionales del transportador de 5-HT en la rata adulta a los 90 DPN. Se encontró una disminución en la concentración, motilidad y viabilidad de los espermatozoides y un aumento en las anomalías en flagelo. Se observó la baja en la expresión del *Sert* en la región superior o *caput* del epidídimo, sin cambios en la expresión de este gen en la *cauda* del epidídimo; y no se modificó la expresión de los transcritos *5-ht1a* y *Mao* en ninguna de las dos regiones analizadas. Por otro lado, se encontró modificación en la expresión de los reguladores postranscripcionales del *Sert* (miR-16 y miR-424) únicamente en la región del *caput*. Por último, las concentraciones de 5-HT se redujeron en el *caput* y aumentaron en la *cauda*.

En conclusión, la administración de CMI en etapa infantil, crítica para el desarrollo del epidídimo y testículo afecta la expresión de *Sert* en el *caput* del epidídimo y sus reguladores postranscripcionales (miR-16 y miR-424) lo que probablemente conlleva a una mala calidad espermática en la edad adulta.

Palabras clave: CMI, *Sert*, epidídimo, 5-HT, miR-16, miR-424, calidad espermática.

## ABSTRACT

The clomipramine (CMI) is a drug used in medicine as treatment of different serotonin (5-HT) activity-related pathologies, for example “depression”. CMI inhibits the 5-HT reuptake and, therefore, its effects are not only in central nervous system, but also alters the function of serotonergic system in reproductive organs like testis and epididymis, as these organs are 5-HT-dependent to carry out muscular movements to sperm transport, microenvironmental changes on epididymis, as well as to get sperm motility. Has been reported that CMI has a spermicidal effect and has been show that alters the spermatic quality in adults. This drug administration in a critical time window for differentiation and development of these organs could cause alterations in adulthood that will reflect on reproductive function, causing irreversible adverse effects; thus, in this project was evaluated the effects of CMI administration (30 mg/kg) in the stage of 8 to 21 postnatal day (PND) on spermatic quality, serotonergic system components and post-transcriptional regulators in adult rats at 90 PND. It was found a decrease in the sperm cells count, motility and viability as well as an increase in tail abnormalities. It was also observed that there is a down modification on *Sert* expression, in the epididymis up region or caput, while there is no change on *Sert* expression in the epididymis tail; and the expression of receptor *5-ht1a* was not modified, nor in the transcript of Mao enzyme in neither of two regions tested. In the other hand, it was found modification in expression of *Sert* post-transcriptional regulators (miR-16 and miR-424) only in caput region. Finally, 5-HT concentrations were reduced in caput and increased in cauda.

In conclusion, the CMI administration on critical stages of epididymis and testis development affect the *Sert* expression in epididymis' caput and its posttranscriptional regulators (miR-16 and miR-424), which probably produce a poor sperm quality in adulthood.

Key words: CMI, *Sert*, epididymis, 5-HT, miR-16, miR-424, sperm quality.

## 1. INTRODUCCIÓN

La 5-hidroxitriptamina (5-HT), también conocida como serotonina, desempeña dos funciones importantes en los mamíferos, una central y otra periférica. En el sistema nervioso central (SNC) actúa como neurotransmisor, controlando funciones cerebrales como la actividad neuronal autónoma, la temperatura corporal, el estado de ánimo, entre otros. La 5-HT varía en su función periférica sobre el control de varios órganos (Kanova & Kohout, 2021). Entre los órganos que contienen componentes del sistema serotoninérgico está el epidídimo, el cual desarrolla funciones esenciales para la reproducción masculina, como el transporte, la maduración y el almacenamiento de los espermatozoides (Dacheux & Dacheux, 2014). Se conoce que alterar el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo perjudica el proceso de maduración y altera la concentración de estas células en el eyaculado (Gil & cols., 2001; Fernández & cols., 2008). El epidídimo es un blanco importante y putativo de diversos compuestos exógenos que afecta la fertilidad, entre ellos están los fármacos antidepresivos como la Clomipramina (CMI). La CMI es un fármaco tricíclico, cuyo mecanismo de acción es inhibir preferentemente el transportador de 5-HT (SERT) y en menor medida el de noradrenalina (NA) (Judd & cols., 1991). Se utiliza para el tratamiento de trastorno obsesivo compulsivo, desorden del pánico y depresión. Dependiendo de la gravedad del trastorno depresivo son prescritos los fármacos antidepresivos como los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (ISRS) y los triciclos (Ko & cols., 2012; Vesga & cols., 2008; Thomas & cols., 2001). Estos mismos se prescriben en infantes y adolescentes con depresión, trastorno obsesivo compulsivo, autismo (Reddihough & cols., 2019; Boaden & cols., 2020).

Estudios concernientes al uso de antidepresivos en pacientes masculinos en edad reproductiva, reportan un número significativo de problemas en la función sexual como es la disminución de la libido y de la fertilidad (Cascade & cols., 2009; Drobnis & Nangia, 2017). De hecho, varios estudios han demostrado que el uso de ISRS como la fluoxetina o sertralina, reducen la concentración, calidad de la integridad del DNA y la motilidad en los espermatozoides eyaculados (Safarinejad, 2008;

Tanrikut & Schlegel, 2007; Montejo & cols., 2001). Mientras que en el tratamiento con CMI en sujetos adultos con trastornos psiquiátricos disminuye el volumen del eyaculado, así como, la motilidad y morfología normal de los espermatozoides (Maier & Koinig, 1994). La mayoría de los estudios evalúan el efecto de los fármacos antidepresivos sobre aspectos reproductivos en sujetos adultos. Sin embargo, hasta el momento no hay estudios del impacto que pudieran ejercer a largo plazo cuando se administran en etapas sensibles como lo es la etapa neonatal e infantil del desarrollo del epidídimo, y los cambios en los componentes del sistema serotoninérgico contenido en este, que puedan afectar la calidad espermática.

## 1.1 SEROTONINA

La 5-HT es un neurotransmisor con un gran número de efectos que se pueden dividir en funciones centrales y periféricas, según el tipo celular y la región en que se localiza y ejerce su acción. La 5-HT es una molécula que se sintetiza en el cerebro, sistema digestivo y aparato reproductor, el 95 % de su síntesis se asocia a células enterocromafines y el 5 % restante a neuronas serotoninérgicas, localizadas en núcleos de rafe (Contreras & Mancillas, 2005). Sus funciones centrales conocidas abarcan desde la regulación del apetito, el sueño, el ritmo cardíaco, la temperatura corporal, funciones cognitivas, estado de ánimo entre muchas otras. En la función periférica, la 5-HT tiene efectos vasoconstrictores en el sistema cardiovascular al inducir la contracción del músculo liso en los vasos sanguíneos, excepto en los del corazón y el músculo esquelético estriado, donde normalmente causa vasodilatación. Sin embargo, en condiciones patológicas, puede llevar a vasoconstricción en estos sitios. Además, promueve la agregación plaquetaria, lo que contribuye al proceso de hemostasia. También se conoce su acción intestinal en la regulación de secreción de iones que a su vez permite la absorción de algunos nutrientes (Alcalde, 2011), propiamente en la reproductiva participa en la regulación del flujo sanguíneo testicular, secreción del factor liberador de corticotropinas por las células de Leydig, contracción de conductos deferentes (Leung, & cols., 1999) y regulación de la secreción de iones en el epidídimo (Cuthbert & Wong, 1986).

El comienzo en la síntesis de 5-HT es el transporte facilitado del aminoácido L-triptófano (Tpr) a las células, las células contienen a la enzima triptófano-hidroxilasa (TPH), que convierte el triptófano en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). La enzima requiere de oxígeno molecular y del cofactor bipteridina, posteriormente, la enzima descarboxilasa de los aminoácidos L-aromáticos (aminoácido descarboxilasa: AADC) convierte la 5-HTP en 5-HT. El paso limitante para la síntesis de la 5-HT es la hidroxilación del Tpr. El catabolismo de la 5-HT, comienza por la desaminación oxidativa por la enzima monoaminoxidasa (MAO). La MAO convierte a la 5-HT en 5-hidroxi-indoleacetaldehído, y este producto es oxidado por una enzima aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD<sup>+</sup> para formar ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) (Contreras & Mancillas, 2005).

Una vez sintetizada la 5-HT, se almacena en vesículas y transporta hacia la hendidura sináptica, donde las vesículas son liberadas mediante un proceso de exocitosis (Kanova & Kohout, 2021).

Ya liberada al medio extracelular, se une a sus receptores, conformados por una familia de receptores que van desde el 5-HT<sub>1</sub> hasta el 5-HT<sub>7</sub> (5-HT<sub>1A</sub>, 1B, 1D, 1E, 1F; 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6 y 7) que están acoplados a proteínas G, excepto el 5-HT<sub>3</sub>, que es un receptor con actividad ionotrópica (Millan & cols., 2008). La concentración de 5-HT en el espacio extracelular depende de su síntesis, del mecanismo de recaptura y de la actividad catalítica de la enzima MAO (Pagano & cols., 2017). Finalmente, cuando la 5-HT ha cumplido su función es recapturada por el SERT, donde puede ser almacenada en vesículas o degradada por la enzima MAO (Pagano, & cols., 2017).

### 1.1.1 Receptores Serotoninérgicos

Los receptores 5-HT<sub>1</sub> se encuentra en regiones límbicas del sistema nervioso central (SNC) y está implicado en trastornos como la ansiedad y el control del estado afectivo (Sullivan & cols., 2005). Estos mismos receptores comprenden cinco subtipos: 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>1D</sub>, 5-HT<sub>1E</sub> y 5-HT<sub>1F</sub> los cuales están acoplados

a proteínas Gi/o que inhiben la enzima adenilato ciclasa, disminuyendo así la producción de AMPc. El receptor 5-HT1A se ubica neuronalmente en el soma de las neuronas post-sinápticas, mientras que el receptor 5-HT1B en las terminaciones sinápticas, sirviendo como autorreceptores que regulan la liberación del neurotransmisor. En el SNC se localizan en corteza y núcleos de rafe, estriado, núcleo accumbens y área tegmental ventral (Carr & Lucki, 2011). Mientras que el 5-HT1A se ha reportado en tracto gastrointestinal en el plexo mientérico (Hannon & Hoyer, 2008).

Se ha demostrado que los ISRS inhiben el SERT y su efecto antidepresivo a largo plazo es promover la desensibilización o regulación a la baja del autorreceptor 5-HT1A, tanto *in vitro* como *in vivo*, induciendo que se incremente la cantidad de 5-HT liberada (Stahl, 2002).

Los receptores 5-HT2A están acoplados a proteínas Gq (Raote & cols., 2007), produciendo un aumento en la hidrólisis del inositol 3-fosfato y de la concentración intracelular del ion  $Ca^{2+}$  (Hoyer & cols., 2002), se localizan en el área postsináptica principalmente en corteza frontal (Carr & Lucki, 2011), en tejidos periféricos están en los vasos sanguíneos, musculo liso de útero y bronquial (Hannon & Hoyer, 2008). Los receptores 5-HT2 y 5-HT3 reciben la información en la neurona postsináptica, regulan el impulso nervioso en la neurona postsináptica a través de inducir su acción a través de segundos mensajeros y su presencia es más significativa en tejidos periféricos (Stahl, 2002; Drevets & cols., 2007).

### 1.1.2 Transportador de 5-HT (SERT)

El SERT es una proteína de membrana que se encarga de llevar la 5-HT al interior de la célula. Esta proteína está codificada por el gen *SLC6A4* y su función principal es reducir la disponibilidad de 5-HT en el medio extracelular. La regulación de la concentración extracelular de 5-HT se realiza a través de este transportador, que es altamente afín para la serotonina y depende de iones de sodio ( $Na^+$ ) y energía. El SERT permite la internalización de parte de la 5-HT liberada durante la transmisión de impulsos eléctricos a través de los axones serotoninérgicos (Alcalde, 2011).

A nivel molecular, el SERT es una proteína integral de membrana que consta de doce dominios transmembrana. Sus extremos amino y carboxilo se encuentran en el lado citoplasmático de la membrana celular. Este transportador opera principalmente mediante un mecanismo de acceso alterno, en el que un sitio de unión en el exterior celular es ocupado simultáneamente por  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y 5-HT. Una vez que este sitio de unión está completamente ocupado, se produce un cambio conformacional que mueve este sitio de unión desde el exterior celular hacia la superficie citoplasmática de la membrana (Alcalde, 2011).

Después de que la 5-HT, el  $\text{Na}^+$  y el  $\text{Cl}^-$  se disocian, el sitio de unión se vuelve a disponer para que el  $\text{K}^+$  pueda unirse. Esto ocurre mientras el sitio de unión está en el interior celular, y provoca otro cambio conformacional que transloca este sitio de unión de regreso al exterior celular. En este proceso, un solo sitio de unión multifuncional es responsable de la circulación de 5-HT,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$  y  $\text{K}^+$  (Alcalde, 2011).

Por tanto, es el mecanismo más efectivo para controlar la actividad del sistema de neurotransmisión serotoninérgica y regular la acción de la 5-HT sobre los receptores pre y postsinápticos (Moya & cols., 2013).

## 1.2 CLOMIPRAMINA

La CMI es un medicamento antidepresivo tricíclico (ATC) que se usa principalmente para tratar el trastorno obsesivo-compulsivo (TOC). Actúa aumentando los niveles de 5-HT y norepinefrina en el cerebro, que son neurotransmisores que desempeñan un papel en la regulación del estado de ánimo y la ansiedad. El uso aprobado por la FDA para la CMI es en el tratamiento del trastorno obsesivo compulsivo (TOC) en individuos de diez años o más. La CMI fue el primer fármaco en ser aprobado por la FDA para el TOC en 1989 (Wilson & Tripp, 2022). Para el tratamiento del TOC, un análisis de varios estudios encontró que la CMI era más efectiva que sertralina, fluoxetina y fluvoxamina. Los investigadores observaron que la CMI mejoró la Escala Obsesivo-Compulsiva Infantil de Yale-Brown (CY-BOCS) en un

37% en niños y adolescentes (Hollander & cols., 2000). La CMI también se utiliza como fármaco de segunda elección para tratar pacientes con depresión, ansiedad, síndrome de cataplejía, insomnio, dolor neuropático, trastorno dismórfico corporal, trastorno de pánico, eyaculación precoz, enuresis nocturna pediátrica y tricotilomanía. Los investigadores llevaron a cabo un análisis que examinó la eficacia relativa en el tratamiento del TOC entre CMI, sertralina, fluvoxamina y fluoxetina; encontraron que la CMI demostró ser la más eficaz (Eddy & cols., 2004; Greist & cols., 1995).

La CMI, es una amina terciaria clasificada como antidepresivo tricíclico (ATC), pertenece a la clase de ATC dibenzazepina. Funciona principalmente como un inhibidor de la recaptación de 5-HT, mostrando una afinidad significativa por el transportador de 5-HT (SERT). Su metabolismo principal ocurre en el hígado, predominantemente a través de la oxidación mediada por el citocromo P450 2D6 (CYP2D6). La vida media de la CMI oscila entre 17 y 28 horas. Posteriormente, se biotransforma a la desmetilclomipramina, la cual tiene mayor actividad. La desmetilclomipramina exhibe una mayor actividad noradrenérgica que serotoninérgica. En el tratamiento del TOC resistente, se suele combinar CMI con fluvoxamina, un inhibidor del CYP1A2. Esta combinación bloquea la conversión de CMI a desmetilclomipramina, lo que resulta en un aumento de la actividad serotoninérgica (Wilson & Tripp, 2022).

La dosis inicial recomendada tanto para adultos como para niños es de 25 mg al día. Posteriormente, se ajusta la dosis en incrementos de 25 mg al día cada 4 a 7 días hasta alcanzar una dosis objetivo que oscila entre 100 mg y 250 mg al día, con un límite máximo de 100 mg al día durante las primeras dos semanas. En el caso de niños (a partir de los diez años) y adolescentes, la dosis diaria típica varía entre 1 y 3 mg por kg de peso corporal. La dosis máxima diaria para tanto niños como adultos es de 250 mg al día. Los médicos pueden recetar CMI en una sola dosis o dividida (Wilson & Tripp, 2022).

Los efectos secundarios de la CMI abarcan náuseas, aumento del apetito, somnolencia, boca seca, estreñimiento, dificultad para orinar, visión borrosa, cefaleas, mareos, cansancio, presión arterial baja, ansiedad, agitación, sudoración, orina de color azul verdoso y problemas reproductivos (Hollander & cols., 2000).

### 1.3 ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

El aparato reproductor masculino está constituido por los testículos, que se encuentran al interior del escroto y son los encargados de la producción de espermatozoides y de la testosterona; mediante los conductos eferentes cada testículo se conecta con un epidídimo, este es un órgano que tiene un papel fundamental en la maduración, la protección y el almacenamiento de los espermatozoides; una vez se da el reflejo eyaculatorio, los espermatozoides son transportados por los conductos deferentes por medio de contracciones musculares y con ayuda de las glándulas accesorias como la próstata y vesículas seminales se produce el líquido seminal, la uretra es el conducto que transporta el semen a través del pene y así culmina la eyaculación, este último durante la excitación sexual, y tras haberse presentado una erección (Picut & Remick, 2017). Como se mencionó anteriormente la producción y maduración de los espermatozoides se lleva a cabo en testículo y epidídimo por lo que este trabajo se centró únicamente en estos órganos.

#### 1.3.1 Testículo

En mamíferos el testículo está conformado por dos compartimentos, tubular e intersticial. El compartimento intersticial, contiene las células de Leydig que producen y secretan andrógenos, como la testosterona que regula la espermatogénesis, también contiene microvasculatura, fibras nerviosas, vasos linfáticos, fibroblastos, macrófagos y tejido conectivo (Holstein & cols., 2003). El compartimento tubular contiene una membrana basal que soporta a las células germinales en distintas etapas de maduración y el epitelio seminífero formado por células Sertoli, este epitelio forma la barrera hematotesticular y es el lugar donde se

lleva a cabo el proceso de espermatogénesis, en dicho proceso las células germinales se diferencian a espermatozoides a través de diversos cambios morfológicos y bioquímicos, una vez formados los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo y son transportados hacia el epidídimo (Holstein & cols., 2003; Hai & cols., 2014).

### 1.3.2 Epidídimo

El epidídimo es un órgano esencial para la reproducción masculina, debido a que proporciona protección y almacenamiento a los espermatozoides durante su maduración. Este órgano se caracteriza por tener distintos tipos celulares que forman un túbulo ultra enrollado, contorneado de forma de medialuna, adherido al testículo y unido por los conductos eferentes. Su longitud varía entre especies, en ratón mide 1 m, en ratas 3 m, en los humanos va de 3-8 m y en equinos tiene una longitud de 80 m (Robaire & Hinton, 2015).

En roedores, el epidídimo se divide en cuatro regiones: el segmento inicial (SI), cabeza (*caput*), cuerpo (*corpus*) y cola (*cauda*). Los humanos no presentan un SI, por lo que la región proximal del conducto se une a los conductos eferentes, los cuales están conformados por células ciliadas y un compartimiento luminal irregular, el epitelio es muy delgado y compuesto por tabiques de tejido conectivo. En todos los mamíferos este epitelio epididimario es sumamente grueso en la región proximal, y conforme se llega a la parte más distal del epidídimo el epitelio es más delgado y el diámetro de la luz aumenta (Robaire & Hinton, 2015).

Entre las funciones más importantes conocidas del epidídimo esta la maduración espermática epididimaria, en este proceso los espermatozoides presentan cambios morfológicos, bioquímicos y fisiológicos que le permiten el reconocimiento de ovocitos, adquirir motilidad y realizar la fecundación. Este proceso tan amplio depende de la regionalización del epidídimo ya que las diferentes células que

conforman el epitelio epididimario brindan microambientes específicos que permiten dichos eventos (Robaire & Hinton, 2015).

En la *cauda*, los espermatozoides son almacenados y permanecen inactivos, en los roedores esta región da paso a concentrar una cantidad suficiente de espermatozoides disponibles para fertilizar en múltiples ocasiones (Bedford, 2015). En el caso de los humanos, tiene una limitada capacidad de almacenamiento que puede agotarse después de 3 eyaculaciones. Se cree que la duración del tránsito epididimario va de 1 a 3 días en humano, mientras que en la rata son de 10 a 12 días (Robaire & Hinton, 2015).

#### *Tipos celulares del epidídimo*

El epidídimo presenta un revestimiento de epitelio pseudoestratificado y está compuesto por distintos tipos celulares que presentan uniones estrechas y que delimitan el compartimento intraluminal. Existen siete tipos de células especializadas que conforman este epitelio epididimario: células principales, claras, estrechas, basales, apicales, halo y células dendríticas, que se encargan de darle la estructura y función al epidídimo, algunas se encuentran a lo largo del epidídimo y otras sólo en regiones específicas (James & cols., 2020).

Las células epididimarias presentan una alta actividad metabólica, endocítica y secretora, acompañada de mecanismos de transporte con el fin de establecer un entorno luminal iónico y acidificación luminal para la maduración de los espermatozoides, facilitando así la transferencia de proteínas de las células del epitelio epididimario a los espermatozoides a través de vesículas denominadas epididimosomas (Zhou & cols., 2019). Otra función del epitelio epididimario es proporcionar protección, debido a que es de los sitios donde los espermatozoides pueden presentar daños causados por patógenos o sustancias nocivas que puedan existir en el torrente sanguíneo. Por lo que las células principales, estrechas, claras y las basales forman la barrera hematoepididimaria (Breton & cols., 2019).

#### *Células principales*

Son el principal tipo celular que conforma el epitelio epididimario, se encuentran a lo largo de todo el órgano y representan entre el 65-80 % del epitelio del epidídimo. Son las responsables de la absorción y secreción de materiales en la luz del epidídimo, debido a que cuentan con una gran actividad de secreción y de endocitosis. Es el principal sitio de la producción de epididimosomas y contribuyen al establecimiento de un entorno luminal ácido (James & cols., 2020). Se sabe que este tipo celular contiene los componentes del sistema serotoninérgico (Jiménez-Trejo & cols., 2007).

#### *Células claras*

Se encuentran distribuidas principalmente en la región de *caput*, *corpus* y *cauda* del epidídimo y tienen una alta actividad endocítica (Breton & cols., 2019). Una de sus funciones es absorber las gotas citoplasmáticas de los espermatozoides durante la maduración. Junto con las células principales y estrechas regulan el pH luminal y proporcionan un entorno luminal ácido con el fin de proteger a los espermatozoides para permanecer inactivos (Cornwall, 2009). Su función endocítica es aún mayor que las células principales, endocitan proteínas específicas en cada región (Robaire & Hinton, 2015).

#### *Células basales*

Se localizan adheridas a la membrana basal a lo largo de todo el epitelio del epidídimo, son delgadas en el sitio basal y más grandes en el polo luminal apical. Juegan un papel esencial para el mantenimiento de la integridad de la barrera hemato-epididimaria (Sullivan & cols., 2019). Pueden influir indirectamente en el ambiente luminal regulando funciones de las células principales (Rinaldi & cols., 2020). Contienen gran acumulación de material secretor dentro de los sáculos de Golgi y gránulos secretores (Robaire & Hinton, 2015).

#### *Células halo*

Se encuentran a lo largo de todo el epitelio del epidídimo, su función principal es la de otorgar inmunidad a los espermatozoides, han sido descritas como linfocitos o

monocitos y se plantea que son una mezcla de diferentes células inmunitarias. Se caracterizan por ser células muy pequeñas de borde estrecho y un citoplasma claro. Se localizan en la base del epitelio epididimario, insertadas entre las células principales (James & cols., 2020).

#### *Células estrechas*

Se encuentran exclusivamente en el segmento inicial del epidídimo, reciben este nombre debido a su forma de copa, siendo más delgadas que las células principales. Mantienen una delgada extensión citoplasmática hacia la membrana basal (Breton & cols., 2019). Contienen múltiples vesículas endocíticas y secretan  $H^+$  hacia la luz del epidídimo (James & cols., 2020).

#### *Células apicales*

Se localizan principalmente en el SI del epitelio epididimario. Se caracterizan por la presencia de un núcleo ovoide localizado apicalmente y no tienen contacto con la membrana basal. Estas células también pueden endocitar sustancias de la luz epididimal. Cuenta con múltiples enzimas proteolíticas y gran cantidad de mitocondrias (James & cols., 2020).

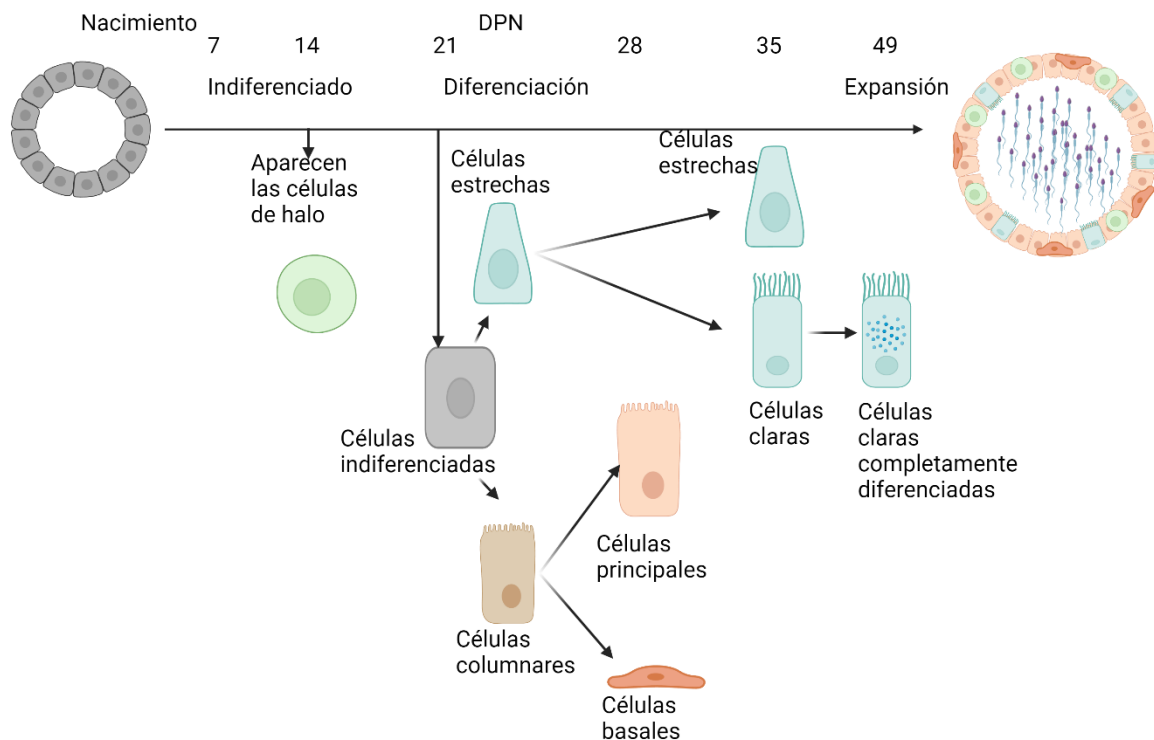
#### *Células dendríticas*

Estas células se encuentran en todo el epidídimo, formando una red, presentan morfología dendriforme y tienen capacidad presentadora de antígenos (Zheng & cols., 2021). Sin embargo, regulan con alta actividad las interacciones del sistema reproductivo e inmunológico (Da Silva & cols., 2011). En el SI son abundantes e interactúan con los espermatozoides y los componentes del lumen, de esta manera mantienen la inmunidad durante la maduración espermática para poder establecer el potencial fertilizante (Geissmann & cols., 2010).

### 1.3.3 Desarrollo postnatal del epidídimo

Se han descrito tres etapas del desarrollo postnatal en el epidídimo de roedores y el humano: el período indiferenciado, el período de diferenciación y el período de

expansión. Al nacer el epitelio es indiferenciado (primera etapa de desarrollo), los segmentos iniciales adquieren superenrollamiento mientras que los distales aún no han alcanzado este estado (Robaire & Hinton, 2015). Durante esta etapa el epitelio del epidídimo se caracteriza por contener células columnares con numerosas mitosis. Se sabe que en el conducto epididimario de rata se da un crecimiento considerable desde periodos gestacionales hasta el día 15 de vida postnatal, cuando alcanza casi 2 m de longitud (Jiang & cols., 1994). Durante el periodo de diferenciación, las células indiferenciadas toman paso para transformarse en células principales, halo, estrechas, claras y las basales. En este periodo se dan cambios fundamentales sobre este órgano; en el día 14 postnatal, se da la aparición de células halo; en el día 15 se observan células estrechas y columnares; para el día 28, las células columnares se diferencian en células basales y principales; a partir del día 36 aparecen células estrechas y claras. Para cuando el organismo llega aproximadamente al día 49 todas las células del epidídimo se han diferenciado de manera completa. Por último, el período de expansión describe el crecimiento continuo del conducto y la aparición de espermatozoides en la luz del túbulo como se muestra en la figura 1 (Robaire & Hinton, 2015).



**Figura 1. Esquema de desarrollo postnatal del epidídimo. Creado en Biorender.com.** Donde se muestran los 3 periodos de desarrollo. El periodo indiferenciado, donde aparecen las células de halo y la diferenciación de células estrechas y columnares. En periodo de diferenciación comienza en el 21 DPN con la diferenciación de células estrechas y columnares y termina con la aparición de células claras al 49 DPN, El periodo de expansión se considera cuando hay presencia de espermatozoides a la luz del túbulo.

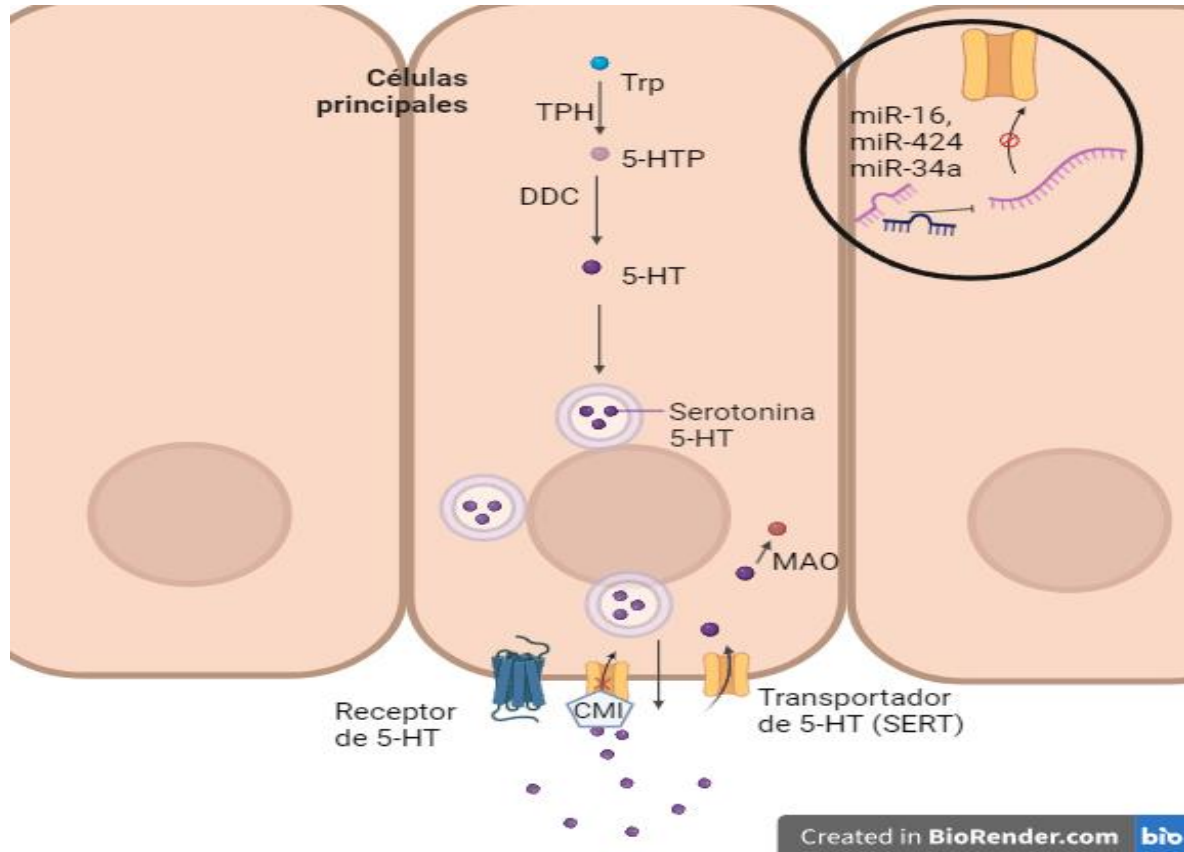
#### 1.4 5-HT Y EPIDÍDIMO

En el epidídimo se han encontrado altas concentraciones de 5-HT. Los primeros estudios por Anderson & cols., en 1979 observaron la presencia de la enzima TPH y de 5-HT en las células principales y de 5-HT en los mastocitos, proponiendo que el epitelio tubular y los mastocitos eran probablemente las fuentes de 5-HT en el epidídimo. Posteriormente, Jiménez-Trejo & cols., (2007) reportaron la existencia de un tipo celular denominadas neuroendocrinas que probablemente constituyen

una fuente adicional de 5-HT en el *caput* del epidídimo, sugiriendo que estas células neuroendocrinas son las mismas células mioepiteliales descritas por Anderson & cols., (1979), bajo el argumento que las células neuroendocrinas se encuentran ubicadas en la base del epitelio del epidídimo, como se ha demostrado en otros órganos reproductores masculinos (Hanyu & cols., 1987). La densidad de mastocitos y células neuroendocrinas en el *caput* del epidídimo cambia durante la maduración sexual, alcanzando un pico alrededor de los 90 DPN. Además, la densidad de mastocitos, las células neuroendocrinas y la concentración de 5-HT siguen un patrón similar entre los 40 y los 90 DPN. Es posible que ambos grupos celulares contribuyan a mantener los niveles de 5-HT en el *caput* principalmente en estas edades (Jiménez-Trejo & cols., 2007). Las células neuroendocrinas transducen estímulos mecánicos y/o químicos, después de su activación, los mensajeros liberados por las células neuroendocrinas modulan la actividad secretora del epitelio, la excitabilidad de los nervios intraepiteliales adyacentes y/o el flujo sanguíneo (Gapp, 1987).

También se ha reportado la presencia de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, y del SERT en el *caput* del epidídimo en células principales (Jiménez-Trejo & cols., 2007), encontrándose en las células endoteliales la presencia de receptores 5-HT<sub>1B</sub> y del SERT. Estas observaciones concuerdan con trabajos previos que muestran la expresión de ambas proteínas en células endoteliales en el sistema nervioso (Daws & cols., 2000). Los receptores 5-HT<sub>1B</sub> y el SERT controlan la liberación de 5-HT y la recaptura de 5-HT respectivamente, y participan en la remodelación de los vasos sanguíneos, la permeabilidad y el flujo sanguíneo (Horschitz & cols., 2021; Wakayama & cols., 2002). Los mastocitos con función inmune se asocian a células claras y dendríticas, también presentan inmunorreactividad para el SERT y los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, pero no para la enzima TPH. La presencia de los receptores 5-HT<sub>1B</sub> en los mastocitos parecen funcionar como autorreceptores que modulan la liberación de 5-HT como en las neuronas serotoninérgicas (Blier & cols., 1998). Mientras que la presencia del SERT respalda la idea que captan 5-HT, pero sin la capacidad de sintetizar 5-HT (Vega & Rudolph, 2002). Las células epiteliales

apicales también presentan inmunorreactividad a los receptores 5-HT1A. Mientras que las células epiteliales probablemente del tipo principal presentan inmunorreactividad al SERT y a los receptores 5-HT3. Se ha considerado que la activación de los receptores 5-HT1A regulan la proliferación celular (Gaspar & cols., 2003) y los receptores 5-HT3 estimulan la secreción en el *caput* del epidídimo como ha sido descrito en los enterocitos (Liu & cols., 2002; Costall & Naylor, 2004). La presencia del SERT en la cara luminal de las células principales sugiere que transfieren 5-HT entre compartimentos o degradan esta amina como se describe en los sistemas neuronales como se muestra en la figura 2 (Horschitz & cols., 2021).



**Figura 2. Esquema del sistema serotoninérgico en las células principales del epidídimo. Creado en Biorender.com.** Las células principales contienen enzimas que transforman el triptófano a 5-HT, y proteínas que regulan la función y concentración de 5-HT.

La existencia de un sistema serotoninérgico local en el epidídimo de la rata indica que podrían regular algunos aspectos de la función reproductiva masculina. Se ha sugerido que la 5-HT liberada por las células epiteliales parecen que participan en la maduración de los espermatozoides a través de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> (Jiménez-Trejo & cols., 2007). Mientras que la 5-HT secretada por las células neuroendocrinas y mastocitos parece afectar la maduración de los espermatozoides al modular la temperatura local, la distribución de nutrientes y/o el apoyo trófico a través del control de la función vasomotora y epitelial (Jiménez-Trejo & cols., 2007). Recientemente, se demostró que la 5-HT participa en la contracción del músculo liso del epidídimo, proceso esencial para el transporte y la emisión de los espermatozoides durante la eyaculación (Mueller & cols., 2019). A través del análisis de contracción del músculo liso en la *cauda* del epidídimo con la administración de agonistas y antagonistas de los receptores 5-HT<sub>1A</sub> y 5-HT<sub>2A</sub>, se determinó también su participación en las contracciones del conducto en la región del *caput* del epidídimo (Mueller & cols., 2019), sugiriendo que alterar las contracciones en el epidídimo cambia el número de espermatozoides. Bezerra & cols., en 2019, reportan que la administración de fluoxetina y sertralina promueven aumento de las contracciones espontáneas de la *cauda* en el epidídimo de las ratas, disminución en la concentración de testosterona sérica, y disminución de la producción diaria de espermatozoides, concluyendo que la alteración en la actividad motora del epidídimo podría estar asociada al bajo conteo espermático y causando tránsito acelerado en el epidídimo de la rata, dando lugar a alteraciones de la fertilidad masculina (Bezerra & cols., 2019).

### 1.5 REGULACION DE LA EXPRESION GÉNICA Y CAMBIOS DE LA ACTIVIDAD DEL SERT

La expresión génica es un proceso complejo en el que intervienen proteínas, DNA y RNA, que determina las funciones celulares dependiendo el tiempo, espacio, intensidad y duración de las señales a los cuales las células responden. Anteriormente, el estudio de la expresión génica se consideraba de acuerdo con el

“dogma central de la biología molecular” donde se menciona que del DNA se transcribe un mRNA y de dicho mensajero se traduce una proteína. Y aunque este dogma sigue estando presente como un punto base para el estudio de la expresión génica y el fenotipo, actualmente se conoce la participación del RNA no codificante como uno de los reguladores de la expresión génica en eucariontes.

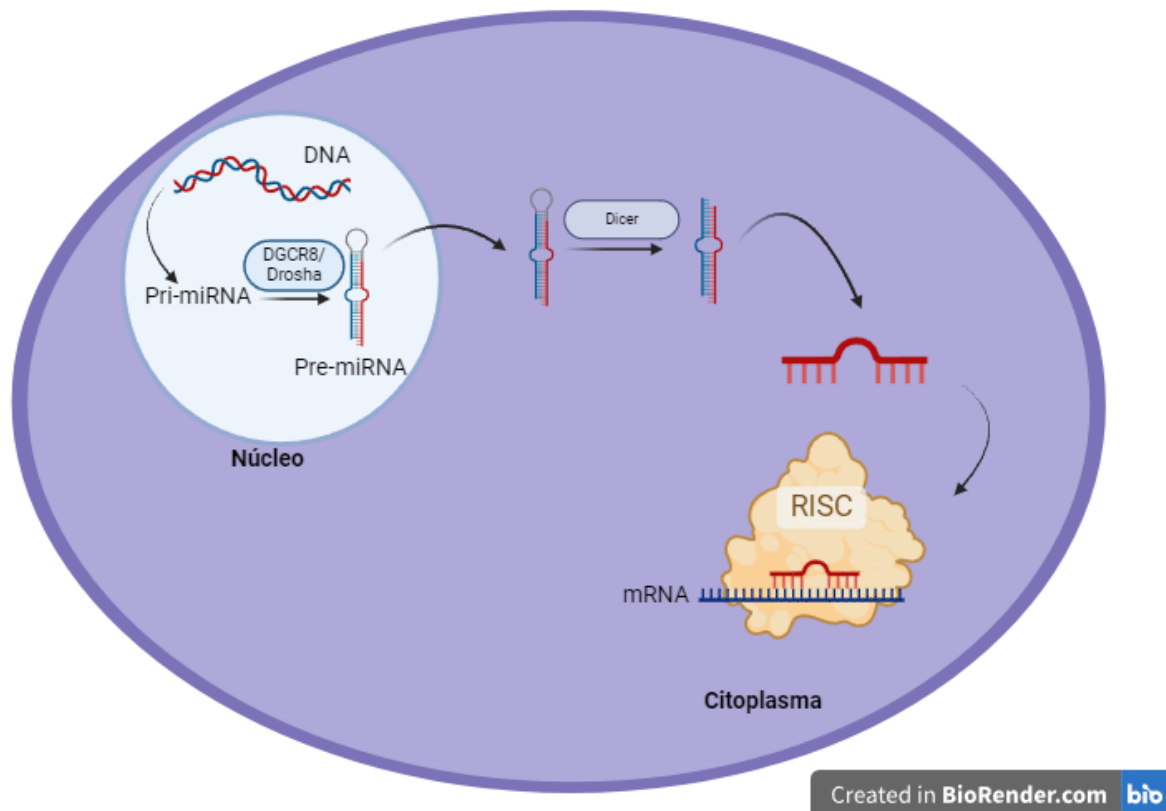
En el proceso después de la transcripción y antes de la traducción el estudio de los microRNAs como reguladores postranscripcionales de la expresión génica ha tomado valor (Shivdasani, 2006).

#### 1.5.1 Moléculas de RNA no codificante como reguladoras de la expresión de proteínas.

Dentro de los procesos celulares de la diferenciación hay una gran cantidad de reguladores que pueden fungir como activadores o represores de ciertas funciones celulares, por la capacidad de regular complejos proteínicos o bien la síntesis de una sola proteína, tal es el caso de los RNAs no codificantes (ncRNAs). Se conocen diferentes tipos de ncRNAs: RNAs asociados a PIWI (piRNAs), RNAs pequeños interferentes (siRNAs) y microRNAs dependientes de DICER (miRNAs) (Holt & cols., 2016). Estos reguladores son expresados diferencialmente por los distintos tipos celulares dependiendo de señales que reciben y su expresión genera respuestas que pueden ser altamente específicas o completamente inespecíficas, además de ser reversibles para mantener el equilibrio energético y el estado celular (Valinezhad & cols., 2014). Los piRNAs y siRNAs regulan funciones transcripcionales mientras que los miRNAs regulan postranscripcionalmente, estos últimos se unen a mRNA y restringen la síntesis proteínica (Holt & cols., 2016). Esta regulación puede ser mediada por el impedimento a generar el complejo proteínico de la traducción o bien reclutar enzimas que promueven el decaimiento del mRNA.

Los miRNAs son cadenas sencillas de RNA, transcritos del genoma de sitios intragénicos e intergénicos. Se inicia la transcripción de miRNAs formando estructuras de bucle en horquilla por un complejo DGCR8 y la enzima Drosha para formar un pre-miRNA de alrededor de 70 nucleótidos. Posteriormente, se

transportan al citoplasma y la endonucleasa Dicer procesa el pre-miRNA en un complejo duplex miRNA de 21 a 24 pares de bases. Una sola hebra de miRNA induce el complejo silenciador miRISK que permite a este, tener un objetivo específico. El emparejamiento de un miRNA generalmente ocurre dentro de la 3' UTR (Región No Traducida) del mensajero como se muestra en la figura 3. En los mamíferos, la complementariedad entre miRNAs y el mensajero no es totalmente perfecto por lo que un miRNA podría regular otros mRNAs (Holt & cols., 2016).



**Figura 3. Esquema de biogénesis de los miRNAs. Creado en Biorender.com.** La biogénesis de los miRNAs comienza en el núcleo formando precursores que se van modificando por medio de proteínas.

Los miRNAs que juegan un rol importante en la maduración y diferenciación del epidídimo. En ratones, la proteína Dicer1 puede dirigir la re-diferenciación del epitelio epididimario, donde el silenciamiento de la enzima Dicer en el epidídimo afecta la morfología de las colas de los espermatozoides y su motilidad, causando una disminución en la fertilidad (Nixon & cols., 2015). También, los miRNAs son importantes mediadores en el papel de los esteroides en la función y maduración

epididimaria. Cabe mencionar, que la acción de los miRNAs en epidídimo es aún un campo poco investigado, aunque ya se han identificado zonas de expresión para estos y cada región del órgano cuenta con una lista abundante de miRNAs diferencialmente expresados (Nixon & cols., 2015).

### 1.5.2 miR-16

En los últimos años se ha descrito la participación del rno-*miR-16*, ubicado en el cromosoma 2q32 en rata, en diferentes procesos biológicos. Entre ellos está el regular la expresión del mRNA del *Sert* encargado de la recaptura de 5-HT y es blanco de ISRS. Estudios en ratones, muestran que el tratamiento crónico con fluoxetina induce aumento en los niveles de *miR-16* en los núcleos del rafe, reduciendo la expresión de *Sert*, considerando que el *miR-16* es un regulador negativo de la expresión del *Sert*. Millan en 2011, describe la regulación y expresión del sistema serotoninérgico por acción de miRNAs, entre los que se destaca la participación de éste en órganos como cerebro, hueso, intestino y tejido adiposo. Evidenciando su posible participación en otros órganos y tejidos. Con base en datos farmacológicos y conductuales, se sugiere que miR-16 contribuye a la acción terapéutica de los antidepresivos ISRS en las neuronas monoaminérgicas (Baudry & cols., 2010). Moya & cols., (2013) confirman que, en líneas celulares de placenta humana y cerebro de rata y ratón, *Sert* es regulado por el hsa-*miR-16*.

El esfuerzo por comprender el control de la regulación postranscripcional del desarrollo de los espermatozoides ha llevado a una mayor apreciación de la importancia de las vías de interferencia del RNA y, en particular, de los miRNAs, como reguladores clave de la espermatogénesis y la maduración de los espermatozoides en el epidídimo. Nixon & cols., en 2015 analizaron la expresión de miRNAs en espermatozoides en diferentes regiones del epidídimo, con el objetivo de evaluar si la expresión de los miRNAs es estática o si está influenciada por su maduración durante el tránsito en el tracto reproductivo masculino. Reportándose modificaciones postesticulares de los miRNAs en los espermatozoides en

condiciones fisiológicas normales. Tales modificaciones incluyen la aparente pérdida y adquisición de una en la expresión de unos 113 y 115 miRNAs, con características semejantes, respectivamente entre los segmentos proximal y distal del epidídimo, entre los que se encuentra el *miR-16* (Nixon & cols., 2015). Debido a que los espermatozoides no son capaces de una transcripción de *novo*, estos hallazgos identifican al epidídimo como un sitio importante en el establecimiento de la presencia de diferentes miRNAs del espermatozoide con el potencial de influir en su maduración, afectando el empaquetamiento del DNA y contribuyendo a la herencia de las características adquiridas y/o alterar la trayectoria de desarrollo de la descendencia resultante (Nixon & cols., 2015). Demostrando que el cambio en las señales que recibe el epidídimo puede alterar la concentración de los espermatozoides debido a la disfuncionalidad causada por los miRNAs (Holt & cols., 2016).

Por otro lado, se ha asociado al *miR-16* con actividades apoptóticas, esta se evidencio al determinar la asociación regulatoria que existe entre *miR-16* y el mRNA de *Bcl-2* (Tang & cols., 2012). Además, se sabe que el miR-16 suprime la expresión de *TNF- $\alpha$* , *IL-6* y *COX-2* en líneas celulares HeLa16 y en células monocíticas THP-1 humanas tratadas con S100b. Un estudio demostró que las moléculas de *miR-16* podrían dirigirse directamente a *Pdcd4* (proteína de muerte celular programada 4) en células derivadas de macrófagos y podrían suprimir la producción de citocinas proinflamatorias. El papel de miR-16 en la inflamación y la respuesta inmunitaria ocurre mediante la regulación de diferentes genes de una manera específica de tejido y célula (Tian & cols., 2016). En la mayoría de los tejidos el miR-16 es considerado dentro de una familia de los inflama-MIR, miRNAs con capacidad de regular negativamente la expresión de la cinasa IKK $\alpha$  (*kappa-B kinase subunit alpha*), esto conlleva a un aumento de IKK $\alpha$ , y fosforilación de NF- $\kappa$ B lo que activa vías proinflamatorias según lo reportado en macrófagos (Alemán-Ávila & cols., 2019). Esto quiere decir que el efecto proinflamatorio depende del tipo celular o tejido analizado.

### 1.5.3 MiR-424

El hsa-miR-424 en humano y su ortólogo, el rno-*miR-322* en rata se ubican en el cromosoma X, este miRNA ha sido asociado a enfermedades mentales como la esquizofrenia, donde se relacionó su participación en el proceso inhibitorio sobre la transcripción del SERT en diferentes tipos celulares de distintas regiones del cerebro (Zaki & cols., 2024; Sherman & cols., 2018). Por otro lado, su efecto en la proliferación celular ha sido considerado de interés ya que puede participar en la progresión de cáncer en diversos tejidos entre los que se encuentra el hígado y el intestino por procesos no relacionados al *Sert* (Zhao & cols., 2021), aunque este proceso no se ha descrito aun en epidídimo. Su participación en la regulación del ciclo celular se ha relacionado con la proteína ABL2, la cual regula el ciclo celular en espermatogonias y espermatoцитos (Gonfloni, 2010) aunque no hay descripciones de la expresión de dicha proteína en el epidídimo podría ser considerado un posible blanco y faltaría investigación respecto a la presencia de dicha proteína.

### 1.5.4 miR-34a

Se conoce la participación del miR-34a en múltiples procesos, entre los que se destaca su actividad en la diferenciación neuronal en diversas regiones del cerebro, también se conoce que la deficiencia de su expresión conlleva al desarrollo de depresión (Lin & Turecki, 2017; Aranha & cols., 2011, Serafini & cols., 2012). Ha sido propuesto como posible regulador de *Sert* por estudios *in silico*, pero no ha sido validado de manera experimental (Żurawek & Turecki, 2021). Ha sido validado para la regulación del receptor 5-HT<sub>2C</sub> en células del núcleo de raphe (Iacono & cols., 2021). Aunque su expresión se considera ubicua, tiene mayor relevancia de actividad en el cerebro, y se desconoce las funciones que posee en el epidídimo, mientras que a nivel reproductivo se relacionó la función del miR-34a con la alteración de motilidad, concentración de espermatozoides y disminución de la concentración de testosterona en un modelo de rata, también se reportó que puede

disminuir su actividad por aumento en las concentraciones de melatonina (Abo & cols., 2022).

## 2. ANTECEDENTES

El efecto del uso de fármacos antidepresivos en la reproducción ha sido de gran interés por alterar no solo la conducta sexual, sino también, por causar problemas fisiológicos que pueden alterar la fertilidad masculina en adultos. Sin embargo, se conoce poco sobre los efectos que tienen algunos ISRS administrados de manera postnatal temprana sobre la reproducción. Se sabe que el tratamiento postnatal temprano con CMI conduce alteraciones conductuales y fisiológicas en la rata en la edad adulta (Mirmiran & cols., 1983). Entre las cuales, las ratas adultas presentan anhedonia, alteración del patrón de sueño, alteración en el patrón motor, disminución en las conductas placenteras como la autoestimulación intracraneal y de la conducta sexual masculina (Vogel & cols., 1998; Bonilla & cols., 1998). Referente a la conducta sexual, la exposición postnatal temprana a CMI disminuye el comportamiento sexual en ratas macho; descrito como una disminución en el porcentaje de machos que copulan, ya que solo el 40 % realiza intromisiones y el 10 % eyacula. Y los animales que alcanzan a copular presentan un aumento en la latencia de montas, de intromisiones, con disminución en el número de eyaculaciones y con intervalos post-eyaculatorios más prolongados (Mirmiran & cols., 1981; Bonilla & cols., 1998; Limón & cols., 2014), alterándose tanto el componente ejecutorio como motivacional.

Referente al efecto que tiene el tratamiento posnatal temprano con CMI sobre la función del epidídimo no ha sido descrito. Datos preliminares en el laboratorio indican un incremento en la reacción acrosomal, parámetro usado como indicador directo de motilidad e indirecto de la capacidad fertilizante (Manosalva & cols., 2005), además de mostrar un incremento en la actividad mitocondrial de los espermatozoides con aumento en las especies reactivas de oxígeno y daño en el DNA.

La CMI bloquea el SERT, dicho bloqueo del SERT durante etapas críticas del desarrollo implicaría alteraciones en la transmisión serotoninérgica. Al respecto, se han demostrado que las ratas tratadas neonatalmente con CMI presentan reducción

en los niveles de 5-HT en el hipotálamo, hipocampo y corteza prefrontal (Vijayakumar & Meti,1999). Sin embargo, no hay evidencia del efecto que tiene sobre la concentración de 5-HT, ni sobre la expresión del SERT, en un órgano que contiene una gran concentración de este modulador químico como es el epidídimo. Respecto al regulador del SERT, previos estudios en el laboratorio muestran que en ratas hembra el tratamiento neonatal con CMI provoca una disminución en la expresión del miR-16 en suero, sugiriendo que el tratamiento neonatal con CMI altera la expresión del SERT.

Por lo que el interés del trabajo fue evaluar los componentes de la maquinaria del sistema serotoninérgico en el epidídimo de la rata, la concentración de 5-HT y su posible relación en la concentración, movilidad, morfología y viabilidad de los espermatozoides en el epidídimo.

### **3. JUSTIFICACIÓN**

Los niños son susceptibles a padecer trastornos de ánimo, como la depresión, por lo que en algunas ocasiones requieren de ayuda farmacológica. Entre los fármacos usados para tratar la depresión está la CMI, la cual se ha asociado a problemas en la reproducción.

Los estudios sobre aspectos reproductivos en humanos se enfocan en sujetos adultos con depresión tratados con antidepresivos como la fluoxetina, CMI y sertralina, reportándose disfunción sexual, disminución de la libido, disminución en el eyaculado (Montejo & cols., 2001), reducción en la concentración y movilidad de los espermatozoides al igual que daño en la integridad del DNA (Safarinejad, 2008; Tanrikut & Schlegel, 2007). Esta disfunción sexual inducida por la administración de fármacos está asociada con cambios en la actividad serotoninérgica, lo que resulta en concentraciones reducidas de testosterona o estradiol en hombres o mujeres respectivamente, además de modificar las células reproductivas y la fertilidad (Solek & cols., 2021), arrojando evidencia sobre los mecanismos de acción de los antidepresivos y su toxicidad asociada con la disfunción del sistema reproductivo.

Sin embargo, no hay estudios en humanos y pocos en animales expuestos a antidepresivos en una etapa vulnerable de la maduración del epidídimo que puede ser la gestación, lactancia y la etapa infantil sobre la función reproductiva del individuo adulto, por lo que alterar la concentración de 5-HT durante el proceso de maduración del epidídimo, puede ser perjudicial en la edad adulta generando anomalías en los procesos reproductivos.

#### 4. OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos del tratamiento postnatal con CMI sobre la calidad espermática, la concentración de 5-HT y la expresión de componentes del sistema serotoninérgico en el epidídimo de ratas Wistar.

#### 5. OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar el efecto del tratamiento postnatal con CMI sobre:

- La calidad espermática de la rata Wistar.
- La concentración de 5-HT en *caput* y *cauda* de epidídimo de ratas adultas.
- La expresión de componentes del sistema serotoninérgico (*Sert*, *Mao* y el receptor *5-ht1a*) en *caput* y *cauda* de epidídimo de ratas adultas.
- La expresión de reguladores postranscripcionales de *Sert* (miR-16, miR-424 y miR-34a) en *caput* y *cauda* en epidídimo de ratas.

#### 6. HIPÓTESIS

El tratamiento postnatal con CMI aumenta la expresión de los reguladores postranscripcionales del *Sert* (miR-16, miR-424 y miR-34a), induciendo una disminución de expresión del transportador, lo que conlleva a una alteración en la recaptura de 5-HT, la expresión de los receptores *5-ht1a* y *Mao* en el epidídimo afectando la calidad espermática de la rata.

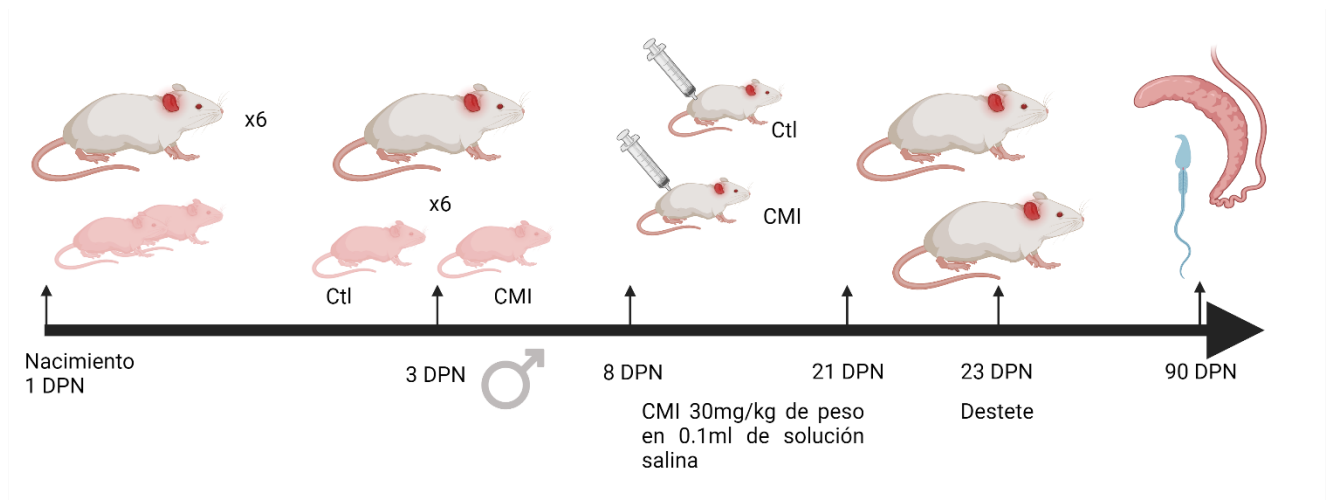
## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### Diseño experimental

Se utilizó un grupo de 6 ratas Wistar preñadas del bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana, unidad Iztapalapa. Se mantuvieron bajo condiciones estándar (temperatura controlada de  $24\pm 2$  °C y ciclo de 12/12 luz-oscuridad), con agua y alimento *ad libitum* (Lab Rodent Diet 5001), con camas de aserrín estéril y en cajas de acrílico de 43 X 53 X 20 cm, sin enriquecimiento ambiental, siguiendo la NOM-062-ZOO-1999 con fundamento en los artículos 35 fracción IV de la Ley Orgánica de la Administración Pública Federal. Al tercer día de nacimiento, las crías machos fueron aleatoriamente distribuidas en un número uniforme de crías en cada camada ( $n = 6$  crías/madre nodriza). Las ratas hembra se eliminaron del procedimiento experimental. Las camadas se distribuyeron aleatoriamente en dos grupos: grupo Control (Ctl) y grupo CMI. Las crías fueron administradas del día 8 al 21 de vida postnatal. Al grupo CMI, se les administró vía subcutánea CMI a una dosis de 30 mg/kg de peso corporal en 0.1 mL de solución salina, una vez al día, mientras que las crías del grupo control se les administró únicamente el vehículo (0.1 mL de solución salina). A los 23 DPN, se destetaron y se alojaron en grupos de 6 animales por caja de acuerdo con su grupo experimental en condiciones estándar durante los siguientes 3 meses, como se muestra en la figura 4. Los animales se mantuvieron en un ciclo de luz-oscuridad de 12 h (encendido a las 9:00 h, apagado a las 21:00 h) con acceso *ad libitum* al alimento y agua.

A la edad de 90 DPN a ambos grupos se les practicó eutanasia por el método de decapitación, con sedación previa con pentobarbital sódico. Se disecó el epidídimo derecho y se obtuvieron los espermatozoides de la región de la *cauda*, se extrajeron a través del método de presión y fueron colocados en medio Biggers-Whitten-Whittingham (BWW: en mM: 95 NaCl, 5 KCl, 1.7 CaCl<sub>2</sub>, 1.1 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.19 MgSO<sub>4</sub> – 7H<sub>2</sub>O, 25.07 NaHCO<sub>3</sub>, 10 HEPES y 5.56 D-glucosa, pH 7.2) (Biggers & cols., 1971) para el análisis de los parámetros de la calidad espermática. El epidídimo izquierdo se disecó en regiones de *caput* y *cauda* para determinar la expresión de miR-16, miR-424 y miR-34a, el *Sert*, el receptor *5-Ht1a* y el transcrito de la enzima *Mao*. Del

mismo tratamiento, de un grupo diferente se utilizó el epidídimo izquierdo regionalizado en *caput* y *cauda* para la cuantificación de 5-HT por HPLC.



**Figura 4. Esquema de administración de CMI en el modelo experimental. Creado en Biorender.com.**

### 7.1. Evaluación de los parámetros de calidad espermática

Se obtuvieron los espermatozoides del epidídimo derecho de acuerdo con el procedimiento descrito por Cervantes & cols., en 2008. Se cortó la base de la *cauda* creando dos incisiones por las cuales se liberaron los espermatozoides por presión, cada sección se depositó en un microtubo con 1 mL de medio BWW. a 37° C, se determinó la calidad espermática evaluando los parámetros de viabilidad, morfología y concentración de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2010).

**Viabilidad:** La viabilidad espermática se determinó por medio de la tinción de eosina-nigrosina, esta tinción permite diferenciar entre espermatozoides muertos y vivos considerando la integridad y permeabilidad de la membrana plasmática de manera que el colorante no penetra en los espermatozoides vivos porque poseen su membrana plasmática intacta (Jiménez & cols., 2002). Se preparó una dilución con la muestra y el colorante a una proporción de 1:1 (5  $\mu$ L de espermatozoides

concentrados y 5µL de colorante), se realizó un frotis y se secó a 37 °C. Se observaron al microscopio óptico con un aumento de 400x. Se contaron 100 células, se consideraron espermatozoides vivos aquellos que no presentaron tinción, y como espermatozoides muertos, los teñidos en color rojo-rosado. Se determinó el porcentaje de viabilidad.

**Morfología:** Con los mismos frotis de eosina-nigrosina se determinó el porcentaje de espermatozoides con anomalías morfológicas (en la cabeza y flagelo del espermatozoide), se evaluaron 100 células al microscopio óptico a un aumento de 400x, el análisis se realizó por triplicado.

**Concentración:** Se determinó mediante una cámara de Neubauer, se tomó una alícuota de 10 µL para realizar un conteo preliminar y proceder a la dilución adecuada, dando prioridad a la dilución de 1:100 (10 µL de espermatozoides lavados y 990 µL de BWW), se colocó una alícuota de 10 µL de la dilución en cada lado de la cámara, se dejó reposar por 1 minuto. Con ayuda del microscopio óptico a un aumento de 400x se contaron 5 cuadrículas de cada lado, posteriormente se utilizó la siguiente fórmula:

$$C = \left(\frac{N}{n}\right) \left(\frac{1}{20}\right) (\text{factor de dilución})$$

N = suma de espermatozoides de ambos lados de la cámara

n= Número de cuadros contabilizados

El resultado fue expresado como millones de espermatozoides por mililitro (mL) de muestra ( $n \times 10^6$  espermatozoides por mL)

## 7.2. Determinación de la expresión para el receptor *5-hta1*, *5-ht2a*, el *Sert* y *Mao*.

### *Obtención y cuantificación del RNA total.*

El tejido se homogenizó en 500  $\mu\text{L}$  de trizol, posteriormente se adicionó 100  $\mu\text{L}$  de cloroformo, para después centrifugar las muestras a 12000 g durante 15 minutos a 4°C, se recolectó el sobrenadante y se agregó un volumen igual de isopropanol (0-4 °C al 0.1 %), las muestras se incubaron de 10-15 minutos a 4 °C.

Posteriormente, se centrifugaron bajo las mismas condiciones antes descritas. El RNA que se precipitó se lavó con etanol al 75% en agua tratada previamente con dietil-pirocarbonato (agua DEPC), el precipitado de RNA se resuspendió en un volumen total de 30-50  $\mu\text{L}$  de agua DEPC. La cantidad y calidad del RNA extraído se evaluó a través del índice de absorbancia de 260/280 nm > 2.1.

### *Síntesis de DNA complementario (cDNA).*

Posteriormente, se llevó a cabo la síntesis del ácido desoxirribonucleico complementario (cDNA) empleando la transcriptasa reversa del virus de la leucemia murina de Moloney. Se tomaron 5  $\mu\text{g}$  de RNA de cada muestra, se adicionó agua estéril y Oligo dT 1  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  para tener un volumen total de 13  $\mu\text{L}$ . Las muestras se desnaturalizaron a 65 °C durante 5 minutos. Inmediatamente después se incubaron a 4 °C durante 5 minutos. Posteriormente, se adicionó un volumen total de 7  $\mu\text{L}$  de la mezcla de reacción que contuvo amortiguador para RT 5X, dNTPs (2'-desoxinucleósido'trifosfatos) (2.5mM): dNPT, dATP, dCTP, dGTP, y dTTP e inhibidor de RNAsa (1 U/ $\mu\text{L}$ ) y retrotranscriptasa (200 U/ $\mu\text{L}$ ) a 42 °C durante 1 hora. Con una etapa final a 70 °C durante 5 minutos.

### *Análisis de la expresión relativa de 5-ht1a, Mao y Sert.*

Se utilizó cDNA de una muestra correspondiente al grupo Ctl elegida al azar, para realizar los rangos dinámicos (curva estándar) para validar la eficiencia de amplificación de las sondas utilizadas y así determinar las concentraciones de cDNA a utilizar para el análisis de la expresión de cada uno de los genes. Se realizaron curvas standard para cada una de las sondas utilizadas a partir de diluciones

seriales del cDNA 1:10, los valores de Ct (cycle threshold) que se obtuvieron a partir de la amplificación se graficaron para formar una regresión semilogarítmica.

Para el análisis de la expresión de los genes de interés se emplearon 25 ng de cDNA por reacción, esto para un análisis por triplicado de cada una de las muestras para realizar un RT-qPCR (40 ciclos a 95 °C de desnaturalización, 60 °C de alineamiento y 60 °C de elongación) con una mezcla de reacción TaqMan® Gene Expression Master Mix.

Las sondas TaqMan® para los transcritos fueron: *5-ht1a* (Rn00561409\_s1), *Mao* (Rn01430950\_m1) y el *Sert* (Rn00564737\_m1) utilizando como gen endógeno y control de expresión el transcrito de *Hprt* (Hipoxantina de guanina fosforibotransferasa) (Rn01527840\_m1).

### 7.3. Detección de miRNAs

Los miRNAs se detectaron y cuantificaron mediante RT-qPCR de dos pasos con un ensayo específico que consta de una primera RT y un diseño de sondas TaqMan (Applied Biosystems). Cada reacción de RT utilizó 1.5 µL(20ng/uL) utilizando el kit de transcripción inversa TaqMan MicroRNA (Applied Biosystems). El programa de reacción constaba de 30 minutos a 16°C, 30 minutos a 42°C y 5 minutos a 85°C. El miRNA se detectó y cuantificó utilizando los ensayos de miRNAs: hsa-miR-16 (000391), rno-miR-424(000604, rno-miR-322-5p MIMAT0001619), hsa-miR-34A (000426, que detecta rno-miR-34a-5p MIMAT0000815) y los genes de referencia U87(001712, AF272707) U6(001973, que detecta rno U6 snRNA NR\_004394) (Applied Biosystems). Los 2 µL de reacción RT se amplificaron en reacciones de 10 µL. Las condiciones del ciclo de PCR fueron de desnaturalización inicial a 95 °C durante 10 minutos, seguida de 45 ciclos a 95 °C durante 15 segundos, a 60 °C durante 60 segundos y a 72 °C durante 1 segundo. La PCR se realizó con un sistema CFX96 Oppus (Biorad) con el kit maestro Quantinova Probe (Qiagen).

#### 7.4 Cuantificación de 5-HT en epidídimo

Del epidídimo izquierdo, la región del *caput* y *cauda* se pesaron en microtubos de 2 mL, se colocaron en hielo seco y posteriormente se almacenaron a -70°C hasta el análisis.

La 5-HT se extrajo usando 400 mL de solución amortiguadora de extracción con ácido ascórbico al 5%, fosfato de sodio 200 mM, L-cisteína 2,5 mM y EDTA 2,5 mM. Luego, las proteínas se precipitaron agregando 100 mL de ácido perclórico 0,4 M incubando a 20°C durante 20 min. Se centrifugaron a 12 000 rpm durante 10 min (4°C); se tomaron los sobrenadantes con 5-HT con filtros de 0.22 µm. Las concentraciones de 5-HT se determinaron mediante HPLC de fase inversa (RP-HPLC) en un sistema integrado por una bomba PU-2089plus (Jasco, Inc), un automuestreador AS-2057 plus (Jasco, Inc) y un detector de fluorescencia XLC™3120FP (Jasco, Inc). Todos los instrumentos se controlaron por el software ChromNav (Jasco, Inc). Las corridas cromatográficas se realizaron utilizando una columna Júpiter C18 (300 Å, 5 µm, 4,6 × 250 mm, Phenomenex®) a 30 °C. La columna se equilibró con la fase móvil "A" con ácido trifluoroacético al 0.1 % en agua, luego se realizó un gradiente lineal desde el minuto 5 al minuto 20 con la fase móvil "B" con ácido trifluoroacético al 0.1 % en acetonitrilo a un caudal de 0,8 mL/min. El detector de fluorescencia se ajustó a una ganancia de 1000, una atenuación de 32, un tiempo de respuesta de 20 s y 280 nm y 315 nm para excitación y emisión, respectivamente. El volumen de inyección de la muestra fue de 50 µL.

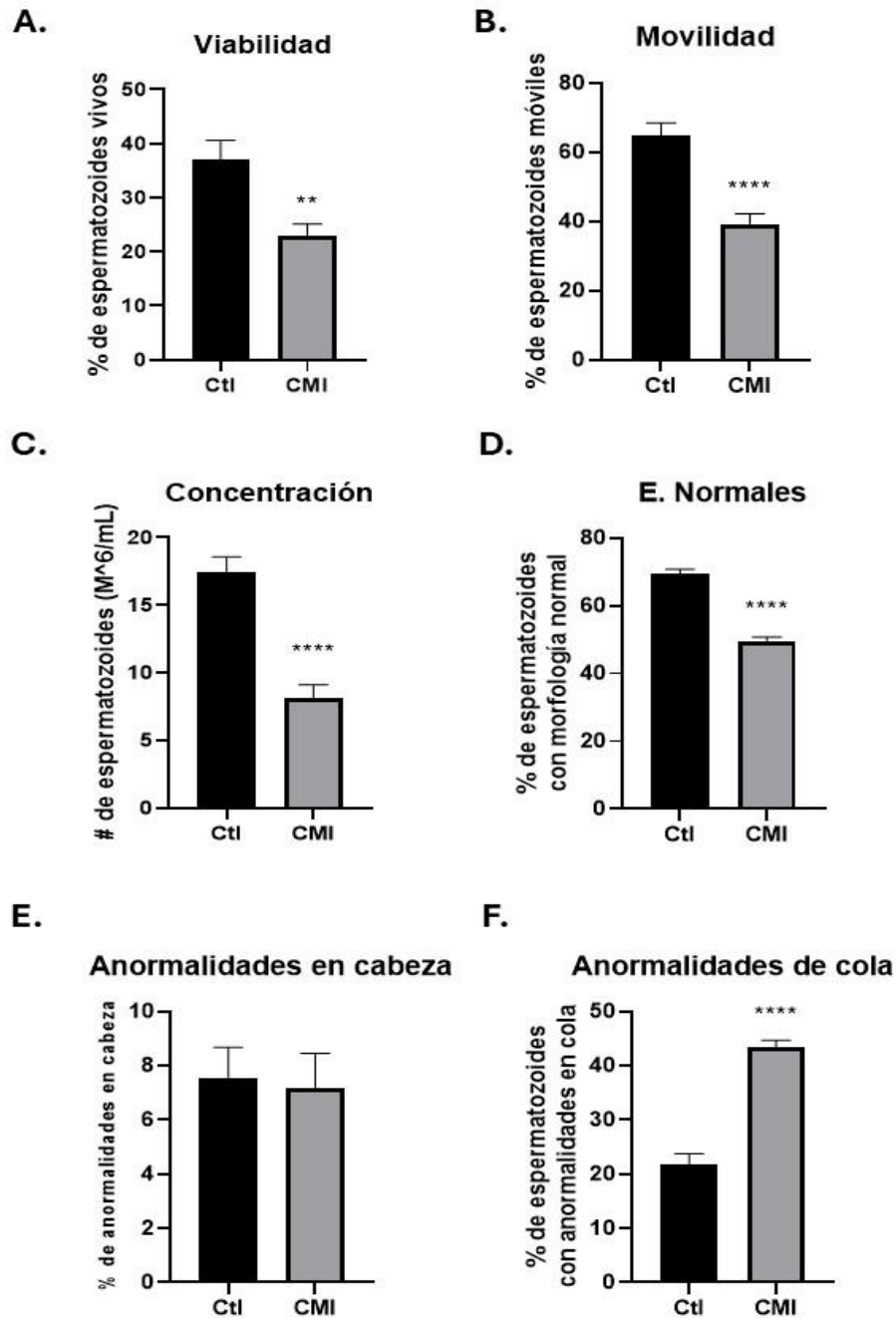
## 7.5 Análisis Estadístico

El análisis estadístico para la calidad espermática, la expresión del *Sert*, *Mao*, rno-miR-16, rno-miR-424, rno-miR-34a y el receptor *5-ht1a* fueron evaluados con una *t*-Student, al cumplir normalidad y U de Mann Whitney al no cumplir con normalidad, se consideraron diferencias a partir de una significancia de  $p < 0.05$ . Los datos se expresaron como la media más el error estándar (EE). Para los análisis de expresión se realizó la prueba de  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ . Todos los resultados fueron analizados mediante el paquete estadístico GraphPad Prism, versión 8.0.1.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Calidad espermática

El análisis de la calidad espermática se muestra en la Fig.5, donde en la viabilidad espermática se observó una disminución de espermatozoides vivos de 14.20 % en el grupo tratado con CMI, se observó diferencia significativa ( $p=0.031$ ) respecto al control (Figura 5A). En la figura 5B se muestra el porcentaje de espermatozoides con movilidad progresiva y no progresiva, el grupo de ratas tratadas con CMI presentaron una reducción significativa ( $p<0.0001$ ) en la movilidad comparada con el grupo control, sólo el 39.2 % de los espermatozoides fueron móviles, a diferencia del grupo control con donde se observó un 64.6 % de espermatozoides móviles en el medio BWW. De manera similar, la concentración espermática se redujo ( $p<0.0001$ ) por efecto del tratamiento postnatal con CMI, con una diferencia de 7.11 millones de espermatozoides por mililitro, como se observa en la figura 5C. En el caso de la morfología espermática los resultados muestran que el porcentaje de espermatozoides con morfología normal es menor en el grupo CMI, con una diferencia de casi el 20 % (figura 5D). Esta disminución se debe al incremento en anomalías de cola (figura 5F). Mientras que las anomalías en la cabeza de los espermatozoides no se afectaron por el tratamiento de CMI (figura 5E).



**Figura 5. A-F. A) Porcentaje de viabilidad espermática.** El porcentaje de espermatozoides vivos es mayor en el grupo control que en el grupo tratado con CMI. Se mostró diferencia significativa considerando un valor de  $p=0.0031$ ,  $df=18$ . **B) Porcentaje de movilidad espermática.** Hay menor movilidad en espermatozoides del grupo CMI comparado con los del grupo control.  $p<0.0001$ ,  $df=17$ . **C) Concentración espermática ( $X^6$ /mL).** Se observa disminución de la concentración de espermatozoides del grupo CMI comparando contra el grupo control.  $p<0.0001$ ,  $df=19$ . **D) Porcentaje de morfología espermática normal.** Se cálculo un mayor porcentaje de espermatozoides morfológicamente normales en el grupo control que en el grupo CMI.  $p<0.0001$ ,  $df=17.78$ . **E) Porcentaje de morfología espermática anormal en cabeza.** No hay diferencia en la

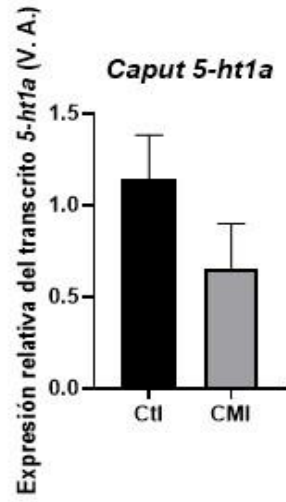
morfología anormal de cabeza entre los grupos.  $p=0.82$ ,  $df=18.99$ . **F) Porcentaje de morfología espermática anormal en cola.** Se observa menor porcentaje de espermatozoides morfológicamente anormales en la región de la cauda del grupo control contra el grupo CMI.  $P<0.0001$ . Se grafica la media + el SEM. Con prueba *t*-Student se determinó diferencia significativa con valor  $P<0.05$ ,  $n=9$  en el control y  $n=11$  en el grupo CMI.

## 8.2 Expresión génica.

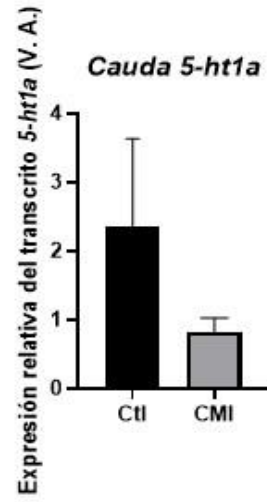
En cuanto a la expresión génica, la figura 6 muestra los efectos de la administración posnatal temprana con CMI sobre la expresión del mRNA para tres diferentes componentes del sistema serotoninérgico (receptor *5-ht1a*, *Sert* y *Mao*) evaluados en el *caput* y *cauda* del epidídimo.

La expresión del transcrito *5-ht1a* en *caput* y *cauda* del epidídimo no se encontraron diferencias significativas entre el grupo tratado y el control como se observa en la Fig.6A y 6B. Una respuesta similar se observó con la expresión de *Mao* en las regiones de *caput* y *cauda* (Figura 6C y 6D respectivamente), donde no hay modificaciones en la expresión del transcrito de la enzima *Mao* por efecto del tratamiento con CMI. Sin embargo, la expresión del transcrito para *Sert* disminuye sólo en la región del *caput* ( $p=0.0022$ ) en el grupo tratado con CMI (figura 6E), sin que se observe ningún efecto en la *cauda* (Figura 6F).

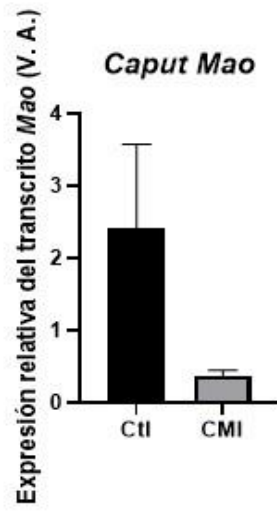
**A.**



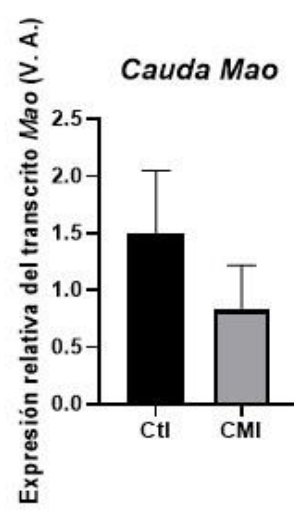
**B.**



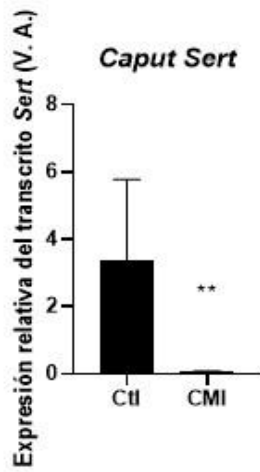
**C.**



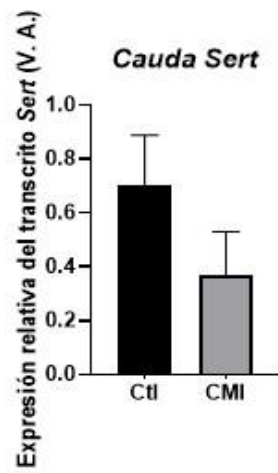
**D.**



**E.**

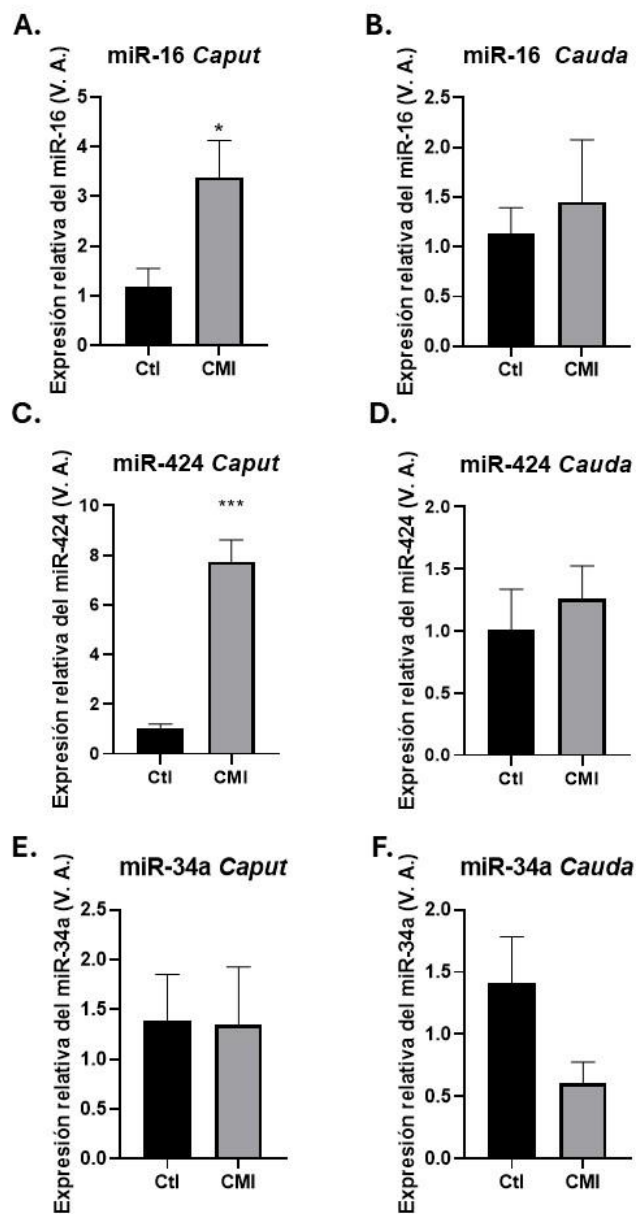


**F.**



**Figura 6. A-F. A) Expresión relativa del transcrito *5-ht1a* en *caput*.** No hay diferencias estadísticas en la expresión del transcrito del gen *5-ht1a* entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.1829$   $df=10$ ). **B) Expresión relativa del transcrito *5-ht1a* en *cauda*.** No hay diferencias estadísticas en la expresión del transcrito entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.2951$   $df=5.23$ ). **C) Expresión relativa del transcrito *Mao* en *caput*.** No hay diferencias estadísticas en la expresión del transcrito del gen entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.0836$   $df=10$ ). **D) Expresión relativa del transcrito *Mao* en *cauda*.** No hay diferencias en la expresión del transcrito del gen entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.35$   $df=8.9$ ). **E) Expresión relativa del transcrito *Sert* en *caput*.** Se evidencia reducción en la expresión del *Sert* en el *caput* del epidídimo en el grupo CMI, con una prueba U de Mann Whitney ( $p=0.0022$   $U=0$ ). **F) Expresión relativa del transcrito *Sert* en *cauda*.** No hay diferencias estadísticas en la expresión del gen entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.3312$   $U=11.50$ ). Se grafica la media + el SEM. Con prueba *t*-Student y  $\alpha=0.05$  se determinó diferencia significativa. A excepción del transcrito del *Sert* que se analizó con prueba de Mann Whitney.  $n=6$  en ambos grupos

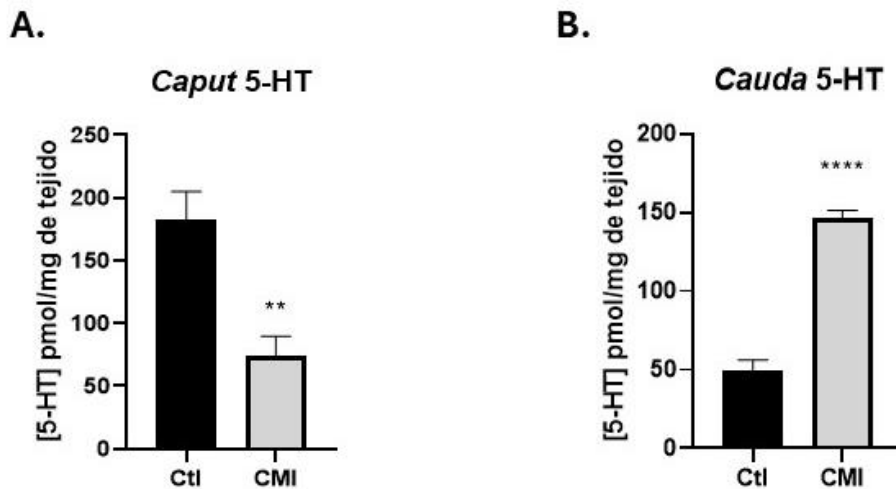
Por otro lado, el tratamiento con CMI alteró la expresión de los miRNAs en la región del *caput* en 2 de los 3 miRNAs evaluados (*miR-16* y *miR-424*) sin afectar su expresión en *cauda* en ninguno de los casos. La expresión del *miR-16* ( $p=0.03$ ) y *miR-424* ( $p=0.0005$ ) se incrementó en la región del *caput* del epidídimo de ratas tratadas con CMI respecto al control, mientras que en la *cauda* no se encontraron diferencias significativas como se muestra en las figuras 7A y 7B. La expresión del *miR-34a* en ratas tratadas con CMI no se modificó en el *caput* ni en la *cauda* del epidídimo, aunque en la región de la *cauda* muestra una tendencia de expresión menor al control, lo cual contrasta con el patrón de expresión del resto de los miRNAs evaluados ya que el *miR-16* y *miR-424* incrementan su expresión (figuras 7E y 7F).



**Figura 7. A-F. A) Expresión relativa del *miR-16* en *caput*.** Hay una elevación del *miR-16* del grupo CMI. ( $p=0.0308$   $df=7.146$ ). **B) Expresión relativa del *miR-16* en *cauda*.** No hay diferencias estadísticas en la expresión del *miR-16* entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.6502$   $df=5.45$ ). **C) Expresión relativa del *miR-424* en *caput*.** Hay un aumento en la expresión del *miR-424* en el grupo CMI. ( $p=0.0005$   $df=5.306$ ). **D) Expresión relativa del *miR-424* en *cauda*.** No hay diferencias estadísticas en la expresión del *miR-424* entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.5699$   $df=8.923$ ). **E) Expresión relativa del *miR-34a* en *caput*.** No hay diferencias estadísticas en la expresión del *miR-34a* entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.9521$   $df=7.59$ ). **F) Expresión relativa del *miR-34a* en *cauda*.** No hay diferencias estadísticas en la expresión del miRNA entre el grupo CMI y el grupo control ( $p=0.093$   $df=6.909$ ). Se grafica la media  $\pm$  el SEM. Con prueba *t*-Student y  $\alpha=0.05$  se determinó diferencia significativa.  $n=6$  en ambos grupos

### 8.3 Concentración de 5-HT.

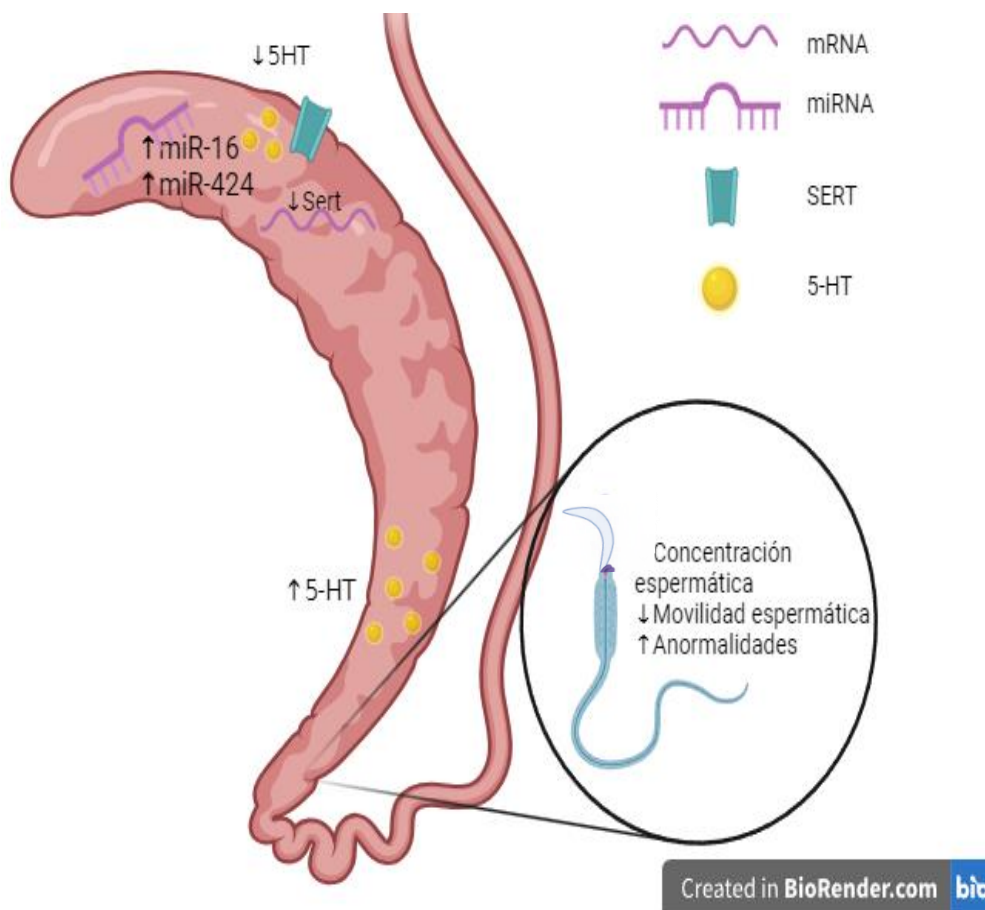
El tratamiento con CMI produjo variaciones en la concentración de 5-HT, de manera región dependiente (Figura 8A y 8B), ya que en la región del *caput* se redujo la concentración de 5-HT siendo de (200 pmol/mg de tejido en controles comparado con 80 pmol/mg en el grupo tratado con CMI ( $p=0.004$ ) como se muestra en la figura 8A; En la región de la *cauda* la diferencia media fue de 96.82 pmol/g de tejido donde se aumenta la concentración de 5-HT en el grupo CMI respecto al control con  $p<0.0001$  como se muestra en la figura 8B.



**Figura 8. A-B A) Concentración de 5-HT en caput.** Hay disminución en la concentración de 5-HT en el grupo CMI. ( $p=0.004$  y  $df=8$ ) **B) Concentración de 5-HT en cauda.** Hay aumento en la concentración de 5-HT en el grupo CMI. ( $p<0.0001$  y  $df=6$ ). Se grafica la media  $\pm$  el SEM. Con prueba  $t$ -Student y  $\alpha=0.05$  se determinó diferencia significativa.  $n=6$  en ambos grupos

## 9. DISCUSIÓN

El tratamiento postnatal con CMI (8-21 DPN) podría afectar la capacidad fertilizante de los espermatozoides a largo plazo según los resultados obtenidos en los parámetros de calidad espermática, se observó una reducción de la motilidad, la viabilidad y concentración espermática, además de inducir un aumento en las anomalías del flagelo en espermatozoides de ratas Wistar. Así mismo, se observaron cambios en la expresión de transcritos de componentes del sistema serotoninérgico y de reguladores de la expresión del Sert, como se muestra en la figura 9.



**Figura 9. Resumen de los resultados. Creado en Biorender.com.** La administración de la CMI afectó los parámetros de calidad espermática y la expresión de componentes del sistema serotoninérgico en regiones específicas del epidídimo a los 90 DPN.

En estudios en animales y humanos se ha visto que el uso de fluoxetina, otros ISRS y CMI, utilizados para el tratamiento de la depresión, trastorno obsesivo compulsivo inducen afecciones reproductivas, desde la expresión de la conducta copulatoria, a nivel de órganos, a nivel celular como los espermatozoides (Bonilla-Jaime & cols., 1998, Limón-Morales & cols., 2014; Tanrikut & Schlegel, 2007).

En humanos adultos el uso de fluoxetina reduce el deseo sexual, aumenta la disfunción eréctil y retarda el reflejo eyaculatorio (Safarinejad, 2008; Tanrikut & Schlegel, 2007). En ratas adultas se ha reportado que la administración de CMI disminuye la cópula, la latencia de eyaculación con aumento en el número de montas indicando disminución de la eficiencia copulatoria (Limón Morales & cols., 2014). En ratas tratadas del día 8 a 21 DPN con dos dosis diarias de CMI de 15mg/kg se observó un aumento de la latencia de monta, de intromisión y de eyaculación, como un aumento en el número de montas con disminución en la frecuencia eyaculatoria (Bonilla-Jaime & cols., 1998, Limón-Morales & cols., 2014). Lo anterior sustenta que el efecto de los antidepresivos depende del periodo de administración, así el tratamiento postnatal temprano con CMI induce a largo plazo daños en el sustrato neuronal y los sistemas de neurotransmisión como la 5-HT que participan en regular la conducta sexual masculina.

Se sabe que los antidepresivos están asociados con efectos secundarios en el ámbito sexual, sus efectos sobre los parámetros del semen y otros marcadores de la fertilidad masculina se han descrito con menos detalle. La mayoría de los estudios se han centrado en fármacos inhibidores de la recaptura de 5-HT con un impacto negativo en la calidad del semen en estudios *in vitro* en animales y humanos (Beeder & Samplaski, 2020). La fluoxetina, en particular, ha sido objeto de múltiples estudios y se ha asociado con efectos gonadotóxicos, incluida la disminución de la concentración, viabilidad y la motilidad de los espermatozoides, el aumento de la fragmentación del DNA de los espermatozoides en el eyaculado y la disminución del peso de los órganos reproductivos (Safarinejad, 2008; Tanrikut & Schlegel, 2007). Los resultados sobre la calidad de semen con ATC son escasos. Estudios clínicos e *in vitro* sobre el efecto de la desipramina reportan efecto en la calidad del

semen, donde se asoció con una inhibición de la movilidad de los espermatozoides dependiente de la dosis. Sin embargo, la evaluación clínica *in vivo* no mostró diferencias en el recuento o la movilidad de los espermatozoides entre los grupos del tratamiento y control, pero el tratamiento con desipramina se asoció con una disminución de la viabilidad de los espermatozoides (Stein, 1981). Particularmente, el uso de CMI en pacientes por periodos largos afecta los seminogramas evaluados y reduce el volumen, movilidad y morfología de los espermatozoides (Maier & Koinig, 1994). En ratas de tres meses de edad la administración de CMI a 2.25 mg/Kg de edad durante 8 semanas, provoca daño a nivel testicular, aumento de ROS (especies reactivas de oxígeno), disminución de enzimas antioxidantes, así como de testosterona circulante; en las pruebas de calidad espermática también disminuye la concentración, movilidad y aumento en el porcentaje de anormalidades. Después de 4 semanas del retiro del fármaco el tejido testicular dañado se recuperó al igual que la concentración de testosterona circulante. Sin embargo, en las pruebas de calidad espermática (concentración, movilidad y anormalidades) y del sistema antioxidante (super oxido dismutasa y malondialdehído) no se restablecieron a nivel del grupo control (El-Sheik & cols., 2021). Lo que sugiere que en el testículo y epidídimo de adultos las alteraciones de la concentración, movilidad, viabilidad y morfología espermática son generadas cuando el fármaco está presente y se restablece la función de los órganos ante el retiro del fármaco, por lo que las alteraciones antes mencionadas, disminuyen.

En contraste con la administración de medicamentos antidepresivos en la edad adulta, esta investigación sugiere que la exposición a CMI durante el desarrollo y la maduración del sistema reproductivo en animales podría tener consecuencias a largo plazo, puesto que encontramos disminución en la viabilidad, movilidad y concentración espermática en la edad adulta.

En el presente trabajo observamos que la administración postnatal de los días 8-21 de una dosis de 30 mg/kg de peso provocan una reducción en la viabilidad, concentración movilidad y morfología normal en los espermatozoides. Lo anterior concuerda con lo reportado por Karimipour & cols., en 2020 donde la administración de fluoxetina durante la lactancia produce efectos secundarios sobre la fertilidad

que permanecen aun cuando se ha retirado el fármaco, manteniendo su efecto hasta la edad adulta. Al respecto, la administración de fluoxetina (20 mg/Kg) en ratones durante la lactancia disminuyó el conteo, la movilidad y viabilidad espermática y aumentó las anormalidades espermáticas junto el porcentaje de espermatozoides inmaduros con aumento en daño en el DNA en la edad adulta (80 DPN). Además, de disminuir el peso corporal, el peso de los testículos, así como el número de células de Leydig. Estas alteraciones en los parámetros de calidad espermática parecen indicar que el tratamiento postnatal con CMI induce daños de larga duración al administrarse en una etapa crítica de desarrollo del testículo y epidídimo alterando el funcionamiento de los tejidos manteniendo el daño en el proceso de espermatogénesis y maduración de los espermatozoides.

Por otro lado, el tratamiento postnatal con CMI reduce la concentración espermática en la edad adulta, lo que podría indicar que induce apoptosis en las espermatogonias o deterioro en el proceso de espermatogénesis. Las evidencias previas a este trabajo indican que la administración de otros ISRS como fluoxetina en ratas durante la gestación y/o lactancia reduce los parámetros de calidad espermática (movilidad, viabilidad, concentración), disminuye el diámetro y la altura del epitelio del túbulo seminífero inducido por una reducción en el número de células de Sertoli (Monteiro y cols., 2014; Karimipour y cols., 2020; Da Silva y cols., 2011). Algunos reportes indican una correlación directa entre el número de células de Sertoli y el proceso de espermatogénesis (Orth & cols., 1988) y una correlación positiva entre el número de estas células y la altura epitelial y el diámetro del túbulo seminífero (Vieira y cols., 2013; Ramos y cols., 2015). Además, una reducción en la población de células de Sertoli contribuye a la disminución del túbulo seminífero (Hooley & cols., 2009), mientras que el bajo conteo espermático se relaciona con una disminución en células germinales (Attia & Bakheet, 2013; Câmara & cols., 2019). Un efecto que se observó ante la administración con fluoxetina y citalopram (Attia & Bakheet, 2013; Câmara & cols., 2019) es el incremento en la actividad de la ubiquitina (UCHL1) en los túbulos seminíferos, reducción en el número de células germinales asociado a una alta tasa de muerte celular lo que conlleva a daños en

las células germinales y los túbulos seminíferos (Cámara & cols., 2019). Lo anterior sugiere que el tratamiento postnatal con CMI también podría reducir la concentración espermática en adultos, posiblemente por sus efectos sobre los túbulos seminíferos, células de Sertoli y células germinales.

Por otro lado, se ha descubierto que algunos antidepresivos, como la imipramina, la CMI y el citalopram, poseen efectos apoptóticos en células neoplásicas. Se descubrió que estos compuestos inducen la muerte celular apoptótica en células HL-60 de leucemia mieloide aguda humana. La apoptosis inducida por los antidepresivos provocó la inducción de actividad similar a caspasa-3/caspasa-3. Mientras que el pretratamiento con un potente inhibidor de caspasa benciloxycarbonil-Val-Ala-Asp-fluorometil-cetona (zVAD-fmk) inhibió la actividad y la apoptosis similar a CPP32/ CPP32 inducida por antidepresivos. Además, la activación de la caspasa inducida por los antidepresivos fue precedida por la hipergeneración de especies reactivas de oxígeno (ROS) intracelulares (Xia et al, 1999), provocando la pérdida de viabilidad celular al activar el proceso apoptótico (Xia et al, 1999).

Los ISRS, como la CMI actúan principalmente sobre el SERT, el cual pertenece al grupo de transportadores neuronales de membrana de sustrato específico dependiente  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ . Además, se ha descrito su actividad en canales  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependientes a voltaje (Lee & cols., 2012; Lee & cols., 2016; Kim & cols., 2017). Los fármacos con acciones de bloqueo de canales iónicos son difíciles de estudiar en la proliferación de células germinales de manera *in vivo*, pero es posible observar su acción en modelos *in vitro*, y el efecto en diferentes tejidos. Un ejemplo es el uso de CMI para inhibir canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$  y  $\text{Na}^+$  dependientes de voltaje en células neuronales y miocárdicas (Li & cols., 2018; Llavoie & cols., 1990) y posiblemente en espermatogonias durante los primeros días de vida postnatal. En la rata, las espermatogonias presentan una alta actividad mitótica, al igual de presencia de células de Leydig y células de Sertoli durante los primeros días de vida postnatal (8-20), células que contienen diferentes canales de  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  y  $\text{K}^+$  dependientes a voltaje (Lee & cols., 2012; Lee & cols., 2016; Kim & cols., 2017). Algunos transportadores iónicos en testículos cumplen funciones importantes en la

espermatogénesis y reproducción en general, manteniendo el equilibrio hídrico y el pH (Salvatore & cols., 1999; Gong & cols., 2002; Hermo & cols., 2010).

Durante los primeros días de vida postnatal del 10 al 20 no se observan presencia de canales de  $K^+$  en espermatogonias, a diferencia de los canales de  $Ca^{2+}$  con presencia desde los 14 días de edad (Santi & cols., 1998), y particularmente los Catsper a las 3 semanas de edad, que coincide con la aparición de espermátidas redondas en los testículos en desarrollo. Los genes Catsper se expresan únicamente en los testículos durante la espermatogénesis, estos son sensibles al cambio de pH favorecido por canales iónicos de  $Ca^{2+}$  ATPasa, canales de  $K^+$ , entre otros. Estos canales Catsper son específicos de espermatozoides, esenciales para la hiperactividad del flagelo, la quimiotaxis, capacitación y reacción acrosomal (Sun & cols., 2017). Modificar el pH y la actividad de los canales de  $Ca^{2+}$  durante la proliferación de las espermatogonias induce alteraciones en los procesos de división celular y en el proceso de espermatogénesis (Santi & cols., 1998). Por tanto, el bloqueo de los canales por la CMI y durante la proliferación celular, podría inducir estrés oxidante y/o apoptosis, generando una disminución en las espermatogonias y así disminuyendo la concentración espermática (Santi & cols., 1998).

En el presente estudio, otros parámetros espermáticos, incluyendo movilidad y morfología, fueron afectados por la administración posnatal temprana de CMI. Los hallazgos revelaron que CMI aumentó significativamente el porcentaje de espermatozoides anormales en el *caput* con una reducción en la *cauda*, resultados que coinciden con los de Karimipour & cols. (2020), que mostraron que la fluoxetina indujo un aumento significativo de espermatozoides anormales en ratones adultos. Estos hallazgos pueden deberse al efecto de la CMI sobre el desarrollo testicular. Durante los primeros días de vida postnatal, particularmente de los días 8-20, la característica predominante de los túbulos es la rápida expansión de las células de Sertoli y las espermatogonias (en espermatogonias tipo A, intermedias y tipo B) con actividad mitótica pronunciada en las poblaciones de espermatogonias, células de Sertoli y células progenitoras de Leydig (Picut & Remick, 2017). Es precisamente durante esta etapa que se administró la CMI (8-21 días) y, aunque el mecanismo

del efecto de la administración posnatal temprana de CMI sobre las anomalías espermáticas sigue siendo desconocido, puede reflejar anomalías en espermocitos primarios y espermátidas asociadas con la infertilidad (Wyrobek & cols., 1984). Otubanjo y Mosuro (2001) encontraron que las anomalías de la cabeza de los espermatozoides se correlacionan con fragmentación del DNA en las células germinales. Estas anomalías de los espermatozoides reflejan mutaciones puntuales en las células germinales que causan alteraciones en los orgánulos celulares involucrados en la formación de la cabeza y la cola, lo que conduce a la anormalidad de los espermatozoides (Alzahrani, 2012 El-Fiky & cols., 2016). Las anomalías de este tipo se manifiestan en espermatozoides de ratas, ratones y humanos expuestos a medicamentos como CMI. Una de las propuestas es también la fragmentación del DNA que las células pueden presentar es por el aumento en ROS.

Las células principales expresan diferentes componentes del sistema serotoninérgico, entre ellos expresan la enzima TPH y contienen 5-HT, además de expresar los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>3A</sub> y el SERT en la región apical, es decir, a la luz del túbulo (Jiménez-Trejo & cols., 2007). Estas células participan en el cambio del microambiente en el túbulo debido a la liberación de iones como el H<sup>+</sup> o el HCO<sup>+3</sup>, que tienen efecto en la maduración del espermatozoide, además se conoce que liberan epididimosomas que pueden contener proteínas que posteriormente se ensamblan en la membrana del espermatozoide o bien contener miRNAs que son transferidos a los espermatozoides o regulan señales entre las regiones del epidídimo (Belleannée, 2015).

En cuanto a los resultados de expresión del mRNA para *Sert*, muestran que la administración de CMI durante la etapa posnatal induce un efecto región dependiente, los datos mostraron una disminución sólo en la región del *caput* del epidídimo, con una tendencia a disminuir en la región de la cauda. Hansen y Mikkelsen (1998) reportaron un efecto similar sobre el *Sert* ante la administración de CMI durante la etapa postnatal (8-21 días), observando una disminución de la expresión del transportador a los 91 DPN en neuronas, lo que implica que la CMI puede alterar los patrones de expresión de manera diferencial sobre los distintos

tipos celulares y de forma diferente dependiendo del periodo de exposición y de la madurez de los tejidos.

La disminución de la expresión del *Sert* en *caput* coincide mecánicamente con los resultados de la expresión del miR-16 y miR-424 los cuales son reguladores postranscripcionales del *Sert*. Ya que al aumentar la expresión de estos miRNAs podría aumentarse su función reduciéndose la expresión del mRNA *Sert*. Mientras que en la cauda no se alteró la expresión de ninguno de los miRNAs evaluados. El miR-16 no solo regula la expresión del *Sert*, también es considerado dentro de una familia de miRNAs denominados inflamaMIR, debido a su capacidad regular negativamente la expresión de la cinasa IKK $\alpha$  (kappa-B kinase subunit alpha), por lo tanto, su subexpresión conlleva con un aumento de IKK $\alpha$ , la cual fosforila a NF-kB y activa vías proinflamatorias según lo reportado en macrófagos (Alemán-Ávila & cols., 2019). Por lo que un proceso inflamatorio parece estar implicado en el efecto de la CMI. En concordancia con lo previamente reportado en cuanto a que la administración de CMI durante 8 semanas provoca incremento en el estrés oxidante e inflamación al disminuir el GSH, SOD y aumentar el MDA y el TNF- $\alpha$  en testículo, corazón e hígado (El-Sheik & cols., 2021), aunque aún no se han reportado datos de epidídimo. Por lo tanto, considerando que la administración de CMI ocasiona inflamación, esta podría ser el inductor a la expresión del miR-16 en la edad adulta de las ratas, manteniendo así una disminución del *Sert*.

Por otro lado, se ha reportado que el miR-424 que también aumentó en el epidídimo, lo que podría inhibir de la progresión de la fase G0 a G1 del ciclo celular de espermatogonias y espermatocitos (Mäkelä & Toppari, 2022). Tal como sucede con la progresión del ciclo celular en células de hepatocarcinoma por la unión a E2F7 (Zhao & cols. 2020). Así la sobreexpresión conjunta del miR-16 y miR-424 en ratas adultas podría estar participando en la disminución de la concentración espermática, la motilidad de los espermatozoides, así como aumento de las anomalías inducidas por la CMI en nuestro estudio y en otros.

Nuestros datos muestran que la 5-HT en el grupo control tuvo concentraciones altas en el caput (150-200 pm/mg de tejido) y bajas en la cauda (~50 pm/mg de tejido); mientras que en el grupo tratado con CMI estas concentraciones se invirtieron y se encontraron concentraciones bajas en el caput (60-90 pm/mg de tejido) y altas en la cauda (~150 pm/mg de tejido). Los cambios en la concentración de 5-HT en las diferentes regiones del epidídimo podría alterar el microambiente del túbulo y por lo tanto afectar la maduración espermática.

Los cambios en la concentración de la 5-HT pueden estar relacionados a la acción de la enzima MAO para su degradación, o bien por la biosíntesis que puede ser afectada por la biodisponibilidad del triptófano, la activación del receptor 5-HT<sub>1A</sub>, el cual en cerebro se conoce que en un proceso inflamatorio este se redirige a la vía de síntesis de kinurenina, por acción de la enzima IDO (indolamino oxidasa), sin embargo en estudios de silenciamiento se observa que no hay respuesta ante el estímulo inflamatorio y dichos autores proponen que esta vía es constitutiva en testículo y por lo tanto no se afecta por la inflamación (Jrad-Lamine & cols., 2013). Otra vía que considerar es el aumento de melatonina inducida por el estrés oxidante en testículo en ratones con daño causado por la administración de citalopram, se observó un aumento en la concentración de esta, así también, disminución de cuerpos apoptóticos y ROS (Moradi & cols., 2023).

## 10. CONCLUSIONES

La realización de este trabajo nos permite concluir que la administración posnatal temprana con CMI tiene efectos adversos a largo plazo en la calidad espermática, así como en la expresión del sistema serotoninérgico y sus reguladores postranscripcionales en las ratas adultas cuando se administra en etapas sensibles del desarrollo del testículo y el epidídimo.

Al parecer no tiene un efecto en la expresión del transcrito del receptor *5-ht1a*, ni en la expresión del transcrito de la enzima *Mao*.

Por el contrario, altera la concentración de 5-HT en las dos regiones analizadas y también aumenta la expresión de *miR-16* y *miR-424* lo que conlleva a la disminución en la expresión del Sert.

Estas alteraciones afectan la maduración espermática, lo que mantiene bajas concentraciones espermáticas, reduce la motilidad y aumenta las anomalías del flagelo a los 90 DPN.

## 11. BIBLIOGRAFÍA

Abo, EG., Soliman, A., Nagla, A., El-Sayed, M., Badawi, A., Emam, N., Abdel, T., Ibrahim, A., Elswaidy, M., Radwan, A., Alshenawy, A., Khaled, E., Kamel, S., El-Saka, H., Madi, M., & Younis, L. (2022). Melatonin epigenetic potential on testicular functions and fertility profile in varicocele rat model is mediated by silent information regulator 1. *British Journal of Pharmacology*, 179(13), 3363–3381. <https://doi.org/10.1111/bph.15804>

Alcalde A. (2011) Importancia del sistema serotoninérgico en la fisiopatología intestinal. [En línea] [Recuperado el 09 de mayo del 2024] [Disponible en <https://docplayer.es/10649841-Ilma-sra-dra-d-a-ana-isabel-alcalde-herrero.html>]

Alemán-Ávila, I., Cadena-Sandoval, D., Jiménez, M., & Ramírez-Bello, J. (2019). MicroRNA en enfermedades autoinmunes. *Gaceta médica de México*, 155(1), 63-71. Epub 01 de julio de 2021. <https://doi.org/10.24875/gmm.18003591>

Alzahrani, A. (2012). Sister chromatid exchanges and sperm abnormalities produced by antidepressant drug fluoxetine in mouse treated in vivo. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2012;16: 2154–61.

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

Aranha, M., Santos, M., Solá S., Steer, J., Rodrigues, P. (2011). miR-34a Regulates Mouse Neural Stem Cell Differentiation. *PLOS ONE* 6(8): e21396. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021396>

Attia, M., Bakheet, A., (2013). Citalopram at the recommended human doses after long-term treatment is genotoxic for male germ cell. *Food Chem Toxicol.* 53:281-5. doi: 10.1016/j.fct.2012.11.051.

Baudry, A., Mouillet, S., Schneider, B., Launay, J., Kellermann, O. (2010). MiR-16 Targets the Serotonin Transporter: A New Facet for Adaptive Responses to Antidepressants. *Science*; 329(5998): 1537–1541.

Bedford, M. (2015). The epididymis re-visited: a personal view. *Asian journal of andrology*, 17(5), 693–698.

Beeder, L. A., & Samplaski, M. K. (2020). Effect of antidepressant medications on semen parameters and male fertility. *International Journal of Urology*, 27(1), 39-46.

Belleannée, C. (2015). Extracellular microRNAs from the epididymis as potential mediators of cell-to-cell communication. *Asian journal of andrology*, 17(5), 730–736. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.155532>

Bezerra, S., Martins, M., Trajano, G., Pontes, A., Gomes, C., Gavioli, C., Silva, D. (2019). Fluoxetine and sertraline effects on rat distal cauda epididymis contraction, sperm count and sperm transit time through epididymis. *Eur J Pharmacol*. 2019 Dec 15;865:172774.

Biggers, D., Whitten, K., Whittingham, G., (1971). The culture of mouse embryos in vitro. *The Culture of Mouse Embryos in Vitro*. San Francisco. W-H-Freeman-Co. pp. 86-116.

Blier, P., Piñeyro, G., el Mansari, M., Bergeron, R., de Montigny, C. (1998). Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 861, 204–216. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1998.tb10192.x>

Boaden, K., Tomlinson, A., Cortese, S., Cipriani, A. (2020). Antidepressants in Children and Adolescents: Meta-Review of Efficacy, Tolerability and Suicidality in Acute Treatment. *Front Psychiatry*. 2020 Sep 2;11:717.

Bonilla, H., Retana, S., Velázquez, J. (1998). Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 60(1),39-45.

Breton, S., Nair, V., Battistone, A. (2019). Epithelial dynamics in the epididymis: role in the maturation, protection, and storage of spermatozoa. *Andrology*, 7(5), 631–643

Câmara, L., Almeida, B., de Santi, F., Rodrigues, M., Cerri, S., Beltrame, L., Sasso-Cerri, E., (2019). Fluoxetine-induced androgenic failure impairs the seminiferous tubules integrity and increases ubiquitin carboxyl-terminal hydrolase L1 (UCHL1): Possible androgenic control of UCHL1 in germ cell death? *Biomed Pharmacother.* 109:1126-1139. doi: 10.1016/j.biopha.2018.10.034.

Carr, V., Lucki, I. (2011). The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology*, 213(2-3), 265–287.

Cascade, E., Kalali, H., Kennedy, H. (2009). Real-world data on SSRI antidepressant side effects. *Psychiatry (Edgmont)*. 2009;6(2):16-18

Contreras, C., Mancillas, A. (2005). El papel de la serotonina en la dependencia al alcohol. *Bases e implicaciones clínicas. Med Sur.*;12(1):3-10.

Cornwall, A. (2009). New insights into epididymal biology and function. *Human reproduction update*, 15(2), 213–227.

Costall, B., Naylor, J. (2004). 5-HT<sub>3</sub> receptors. *Current Drug Targets-CNS & Neurological Disorders*, 3(1), 27-37.

Cuthbert, W., Wong, Y. (1986). Electrogenic anion secretion in cultured rat epididymal epithelium. *J Physiol. Sep*;378:335-45.

Da Silva, N., Cortez, V., Reinecker, C., Wildgruber, M., Hill, E., Brown, D., Swirski, K., Pittet, J., Breton, S. (2011). A dense network of dendritic cells populates the murine epididymis. *Reproduction (Cambridge, England)*, 141(5), 653–663.

Dacheux, L., Dacheux, F. (2014). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction*, 147(2), R27-R42.

Daws, C., Gould, G., Teicher, D., Gerhardt, A., & Frazer, A. (2000). 5-HT(1B) receptor-mediated regulation of serotonin clearance in rat hippocampus in vivo. *Journal of neurochemistry*, 75(5), 2113–2122. <https://doi.org/10.1046/j.1471-4159.2000.0752113.x>

Devaangam, S. S., Satyanarayana, S., Kumar, E., Vivek, B., Velmurugan, C., & Kumar, A. (2011). The effect of amantadine on clomipramine induced sexual dysfunction in male rats. *Oman Medical Journal*, 26(6), 404.

Drevets, C., Thase, E., Moses, L., Price, J., Frank, E., Kupfer, J., Mathis, C. (2007). Serotonin-1A receptor imaging in recurrent depression: replication and literature review. *Nuclear medicine and biology*, 34(7), 865–877.

Drobnis, E., Nangia, K. (2017). *Impacts of Medications on Male Fertility*. Springer International Publishing. DOI <https://doi.org/10.1007/978-3-319-69535-8>

Eddy, T. Dutra, L., Bradley, R., Westen, D. (2004) A multidimensional meta-analysis of psychotherapy and pharmacotherapy for obsessive-compulsive disorder. *Clin Psychol Rev.*2004 Dec;24(8):1011-30.

El-Fiky, S. A., Abou-Zaid, F. A., Farag, I. M., Fahmy, M. A., & El-Fiky, N. M. (2016). Genotoxic effect of the tricyclic antidepressant drug clomipramine hydrochloride in somatic and germ cells of male mice. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*, 6(4), 321-327.

El-Sheik, M., Eleiwa, Z., Khairy, M., Abd El-Aziz, M., Metwally, M., Galal, A. (2021). Comparative effect of administration and discontinuation of sildenafil and/or clomipramine on the hepatic, cardiac and testicular tissues of male rats. *Andrologia*, 53(4), e13983.

Fernández, R., Rubio, J., Villalobos, G., Quintero, A., López, G., Estes, C., Corona, B. (2008). Caracterización morfométrica de la cabeza del espermatozoide porcino mediante análisis computarizado (Resultados Preliminares). *Revista Científica*, 18(5), 570-577.

Gapp, A. (1987). The endocrine pancreas. In: I. Chester-Jones, P. M. Ingleton & J. G. Phillips (eds), *Fundamentals of comparative vertebrate endocrinology*, pp. 579-622.

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

Geissmann, F., Gordon, S., Hume, A., Mowat, M., Randolph, J. (2010). Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, 10(6), 453–460.

Gil, E., Ollero, M., Lopez, M., Sharma, K., Alvarez, G., Thomas, J., Agarwal, A. (2001). Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod.*16(9):1922-30.

Gonfloni, S. (2010). DNA damage stress response in germ cells: role of c-Abl and clinical implications. *Oncogene*, 29(47), 6193-6202.

Gong, D., Li, C., Leung, P., Cheung, H., Wong, Y. (2002). A BK(Ca) to K(v) switch during spermatogenesis in the rat seminiferous tubules. *Biology of reproduction*, 67(1), 46–54. <https://doi.org/10.1095/biolreprod67.1.46>

Greist, H., Jefferson, W., Kobak, A., Katzelnick, D., Serlin, R., (1995) Efficacy and tolerability of serotonin transport inhibitors in obsessive-compulsive disorder. A meta-analysis. *Arch Gen Psychiatry.* 1995 Jan;52(1):53-60.

Griswold, D. (2018). 50 years of spermatogenesis: Sertoli cells and their interactions with germ cells. *Biology of reproduction*, 99(1), 87–100.

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.

Hannon, J., Hoyer, D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural brain research*, 195(1), 198–213

Hansen, H., Mikkelsen, D. (1998). Long-term effects on serotonin transporter mRNA expression of chronic neonatal exposure to a serotonin reuptake inhibitor. *European journal of pharmacology*, 352(2-3), 307–315. [https://doi.org/10.1016/s0014-2999\(98\)00349-5](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(98)00349-5)

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

Hermo, L., Pelletier, M., Cyr, G., Smith, E., (2010). Surfing the wave, cycle, life history, and genes/proteins expressed by testicular germ cells. Part 4: intercellular bridges, mitochondria, nuclear envelope, apoptosis, ubiquitination, membrane/voltage-gated channels, methylation/acetylation, and transcription factors. *Microsc Res Tech*. 73(4):364-408. doi: 10.1002/jemt.20785.

Hinton, T., Galdamez, M., Sutherland, A., (2011). How do you get six meters of epididymis inside a human scrotum? *J Androl* 2011;32:558–64.

Hollander, E., Kaplan, A., Allen, A., Cartwright C. (2000) Pharmacotherapy for obsessive-compulsive disorder. *Psychiatr Clin North Am*. 2000 Sep;23(3):643-56.

Holstein, F., Schulze, W., Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 1, 107.

Holt, J., Stanger, J., Nixon, B., McLaughlin, A. (2016). Non-coding RNA in spermatogenesis and epididymal maturation. *Non-coding RNA and the Reproductive System*, 95-120.

Hooley, R., Paterson, M., Brown, P., Kerr, K., Saunders, K. (2009). Intra-testicular injection of adenoviral constructs results in Sertoli cell- specific gene expression and disruption of the seminiferous epithelium. *Reproduction*. 137(2):361-70. doi: 10.1530/REP-08-0247.

Horschitz. S., Hummerich, R., Schloss, P. (2021). Structure, function and regulation of the 5-hydroxytryptamine (serotonin) transporter. *Biochem Soc Trans*; 29:728–732.

Hoyer, D., Hannon, P., Martin, R. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 71(4), 533–554.

Iacono, L., Ielpo, D., Parisi, C., Napoli, G., Accoto, A., Di Segni, M. & Andolina, D. (2021). MicroRNA-34a regulates 5-HT<sub>2C</sub> expression in dorsal raphe and contributes to the anti-depressant-like effect of fluoxetine. *Neuropharmacology*, 190, 108559.

James, R., Carrell, T., Aston, I., Jenkins, G., Yeste, M., Salas, A. (2020). The Role of the Epididymis and the Contribution of Epididymosomes to Mammalian Reproduction. *International journal of molecular sciences*, 21(15), 5377.

Jiang, X, Smith, P., Wreford, G. (1994). Postnatal differentiation and development of the rat epididymis: a stereological study. *Anat Rec* 1994;238:191–8.

Jiménez-Trejo, F., Tapia, M., Queiros, C., Padilla, P., Avellar, C., Manzano, P., Manjarrez, G., Gutiérrez, G. (2007). Serotonin Concentration, Synthesis, Cell Origin, and Targets in the Rat Caput Epididymis During Sexual Maturation and Variations Associated With Adult Mating Status: Morphological and Biochemical Studies. *Journal of Andrology*, Vol. 28, No. 1.

Jiménez-Trejo, F., Coronado, I., Boeta, M., González, I., Viguera, R., Herrera, A. (2018). Identification of serotonergic system components in stallion sperm. *Histol Histopathol Sep*;33(9):951-958. doi: 10.14670/HH-11-989.

Jrad-Lamine, A., Henry-Berger, J., Damon-Soubeyrand, C., Saez, F., Kocer, A., Janny, L., Drevet, J. R. (2013). Indoleamine 2, 3-dioxygenase 1 (ido1) is involved in the control of mouse caput epididymis immune environment. *PloS one*,8(6), e66494.

Judd, K., Chua, P., Lynch, C., Norman, T. (1991). Fenfluramine Augmentation of Clomipramine Treatment of Obsessive Compulsive Disorder. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* 25, 412–414.

Kanova, M., Kohout, P. (2021). Serotonin-Its Synthesis and Roles in the Healthy and the Critically Ill. *International journal of molecular sciences*, 22(9), 4837.

Karimipour, M., Ahmadi, A., Zirak, M., Jafari, A., Mohebi, M., Hosseinalipour, E. (2020). The effects of exposure to fluoxetine during lactation on testicular tissue and sperm parameters in mice offspring. *Veterinary research forum : an international quarterly journal*, 11(1), 35–42. <https://doi.org/10.30466/vrf.2018.82090.2082>

Kim, S., Li, H., Kim, W., Shin, E., Seo, S., An, R., Ha, S., Han, T., Hong, H., Choi, W., Lee, S., Park, S. (2017). Escitalopram, a selective serotonin reuptake inhibitor, inhibits voltage-dependent  $\text{Ca}^{2+}$  channels in coronary arterial smooth muscle cells. *Korean J Physiol Pharmacol*. 21(4):415-421. doi: 10.4196/kjpp.2017.21.4.415.

Ko, Y., Farr, L., Dietz, M., Robbins, C:(2012). Depression and treatment among U.S. pregnant and nonpregnant women of reproductive age, 2005-2009. *J Womens Health (Larchmt)* 2012; 21:830.

Lee, A., Kim, S., Hyun, A., Park, G., Kim, J., (2012). Wide spectrum of inhibitory effects of sertraline on cardiac ion channels. *Korean J. Physiol Pharmacol*. 16(5):327-32. doi: 10.4196/kjpp.2012.16.5.327

Lee, M., Hahn, J., Choi, H. (2016). Blockade of Kv1.5 channels by the anti-depressant drug sertraline. *Korean J Physiol Pharmacol*. 20(2): 193–200. doi: 10.4196/kjpp.2016.20.2.193.

Leung, P., Dun, L., Dun, J., Wong, Y. (1999). Serotonin via 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. *The Journal of Physiology*, 519, 657-670. doi:10.1111/j.1469-7793.1999.0657n.x

Li, H., Shin, E., An, R., Seo, S., Ha, S., Han, T., Hong, H., Firth, L., Lee, S., Yim, J., Lee, M., Choi, G., Choi, W., Park, S. (2018). Blockade of voltage-dependent  $\text{K}^{+}$  current in rabbit coronary arterial smooth muscle cells by the tricyclic antidepressant clomipramine. *J Pharmacol Sci*. 137(1):61-66. doi: 10.1016/j.jphs.2018.04.005.

Limón-Morales, O., Soria, C., Arteaga, M., Vázquez, G., Bonilla, H. (2014). Altered expression of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in adult rats induced by neonatal treatment with clomipramine. *Physiology & behavior*, 124, 37–44.

Lin, R., Turecki, G. (2017). Noncoding RNAs in depression. *Neuroepigenomics in Aging and Disease*, 197-210.

Liu, Y., Zhuang, B., Lunderberg, T., Yu, C. (2002). Involvement of 5-hydroxytryptamine<sub>1A</sub> receptors in the descending anti-nociceptive pathway from periaqueductal gray to the spinal dorsal horn in intact rats, rats with nerve injury and rats with inflammation. *Neuroscience*, 112(2), 399-407.

Llavoie, A., Beauchamp, G., Elie, R. (1990). Tricyclic antidepressants inhibit voltage-dependent calcium channels and Na<sup>(+)</sup>-Ca<sup>2+</sup> exchange in rat brain cortex synaptosomes. *Can J Physiol Pharmacol*. 68(11):1414-8. doi: 10.1139/y90-215.

Maier, U., Koinig, G. (1994). Andrological findings in young patients under long-term antidepressive therapy with clomipramine. *Psychopharmacology*. 1994 Nov;116(3):357-9.

Mäkelä, A., Toppari, J. (2022). Retinoblastoma-E2F Transcription Factor Interplay Is Essential for Testicular Development and Male Fertility. *Front Endocrinol (Lausanne)*. 2022 May 19;13:903684. doi: 10.3389/fendo.2022.903684. PMID: 35663332; PMCID: PMC9161260.

Manosalva, I., Cortés, C., Leyva, V., Valdivia, M., De los Reyes, M., Barros, C., Moreno, R. (2005). Efecto de la refrigeración sobre la motilidad, integridad de membrana acrosomal y reacción acrosomal en espermatozoides caninos. *Rev Inv Vet Peru* 16: 114-128

Mead, E., Atkinson, G., Richter, B., Metzendorf, M., Baur, L., Finer, N., Corpeleijn, E., O'Malley, C., Eells, L. (2016). Drug interventions for the treatment of obesity in children and adolescents. *Cochrane Database Syst Rev*. 2016 Nov 29;11(11):CD012436.

Millan, J. (2011). MicroRNA in the regulation and expression of serotonergic transmission in the brain and other tissues. *Current opinion in pharmacology*, 11(1), 11–22.

Millan, J., Marin, P., Bockaert, J., Mannoury la Cour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in pharmacological sciences*, 29(9), 454–464.

Mirmiran, M., van de Poll, E., Corner, A., van Oyen, G., Bour, L. (1981). Suppression of active sleep by chronic treatment with chlorimipramine during early postnatal development: effects upon adult sleep and behavior in the rat. *Brain Res* 204: 129–146.

Mirmiran, M., Scholt, colsens, J., Van de Poll, N., Uylings, H., van der Gusten, J., de Boer, G. (1983). Effects of experimental suppression of active (REM) sleep during early development upon adult brain and behavior in the rat. *Developmental Brain Research*, 7, 277-286

Monteiro, O., de Torres, M., Amorim, J., Andrade, J., de Moraes, N., Tenorio, M., Da Silva Jr, A. (2014). Fluoxetine induces changes in the testicle and testosterone in adult male rats exposed via placenta and lactation. *Systems biology in reproductive medicine*. 60(5):274-81. doi.org/10.3109/19396368.2014.933984.

Montejo, L., Llorca, G., Izquierdo, A., Rico, F. (2001). Incidence of sexual dysfunction associated with antidepressant agents: A prospective multicenter study of 1,022 outpatients. Spanish working group for the study of psychotropic-related sexual dysfunction. *J Clin Psychiatry* 2001; 62(Suppl 3): 10-21.

Moradi, M., Hashemian, A., Douhandeh, E., Peysokhan, M., Hashemian, H., Faramarzi, A. (2023). The protective role of melatonin in citalopram-induced reproductive toxicity via modulating nitro-oxidative stress and apoptosis in male mice. *Reproductive Toxicology*, 118, 108368.

Moya, R., Wendland, R., Salemme, J., Fried, L., Murphy, L. (2013). miR-15a and miR-16 regulate serotonin transporter expression in human placental and rat brain raphe cells. *The international journal of neuropsychopharmacology*, 16(3), 621–629.

Moya, Pablo. (2014). Mini-revisión: Variantes genéticas del transportador de serotonina en trastornos neuropsiquiátricos. *Revista chilena de neuro-psiquiatría*, 52(2), 115-122.

Mueller, A., Kiguti, A., Silva, R., Pupo, P. (2019). Contractile Effects of Serotonin (5-HT) in the Rat Cauda Epididymis: Expression and Functional Characterization of 5-HT Receptors. *J Pharmacol Exp Ther* 369:98–106.

Neto, T., Bach, V., Najari, B., Li, S., Goldstein, M. (2016). Spermatogenesis in humans and its affecting factors. *Seminars in cell & developmental biology*, 59, 10–26.

Nixon, B., Simone, S., Bettina, P., Jackson, R., Anderson, L., Sonika, T., Holt, McLaughlin, A. (2015). The MicroRNA Signature of Mouse Spermatozoa Is Substantially Modified During Epididymal Maturation. *Biology of Reproduction* 93(4):91, 1–20.

Orth, M., Gunsalus, L., Lamperti, A. (1988). Evidence from Sertoli cell-depleted rats indicates that spermatid number in adults depends on numbers of Sertoli cells produced during perinatal development. *Endocrinology*. 122(3):787-94. doi: 10.1210/endo-122-3-787.

Otubanjo, A., Mosuro, A. (2001). An in vivo evaluation of induction of abnormal sperm morphology by some anthelmintic drugs in mice. *Mutat Res*. 18;497(1-2):131-8. doi: 10.1016/s1383-5718(01)00250-9.

Pagano, G., Niccolini, F., Fusar-Poli, P., Politis, M. (2017). Serotonin transporter in Parkinson's disease: A meta-analysis of positron emission tomography studies. *Annals of neurology*, 81(2), 171-180.

Picut, A., Remick, A. (2017). Impact of Age on the Male Reproductive System from the Pathologist's Perspective. *Toxicol Pathol* 45(1):195-205.

Ramos, C., dos Santos, H., Silveira, M., Kiss, C., Mesquita, F., Gerardin C. (2015). Maternal treatment with fluoxetine promotes testicular alteration in male rat pups. *Reprod Fertil Dev.* doi: 10.1071/RD14199.

Raote, I., Bhattacharya, A., Panicker, M. (2007). Serotonin 2A (5-HT<sub>2A</sub>) Receptor Function: Ligand-Dependent Mechanisms and Pathways. In A. Chattopadhyay (Ed.), *Serotonin Receptors in Neurobiology*. CRC Press/Taylor & Francis.

Reddihough, S., Marraffa, C., Mouti, A., O'Sullivan, M, Lee, J., Orsini, F., Hazell, P., Granich, J., Whitehouse, O., Wray, J., Dossetor, D., Santosh, P., Silove, N., Kohn, M. (2019). Effect of Fluoxetine on Obsessive-Compulsive Behaviors in Children and Adolescents With Autism Spectrum Disorders: A Randomized Clinical Trial. *JAMA.*;322(16):1561-1569.

Rinaldi, D., Donnard, E., Gellatly, K., Rasmussen, M., Kucukural, A., Yukselen, O., Garber, M., Sharma, U., Rando, J. (2020). An atlas of cell types in the mouse epididymis and vas deferens. *eLife*, 9, e55474.

Robaire, B., Hinton, T. (2015). The Epididymis. En: Knobil and Neill's *Physiology of Reproduction*, 4th ed, T.M. Plant & A.J. Zeleznik, Eds. USA: Elsevier, pp 619-677.

Safarinejad, R. (2008). Sperm DNA damage and semen quality impairment after treatment with selective serotonin reuptake inhibitors detected using semen analysis and sperm chromatin structure assay. *J. Urol.* 180, 2124–2128.

Salvatore, L., D'Adamo, C., Polishchuk, R., Salmons, M., Pessia, M. (1999). Localization and age-dependent expression of the inward rectifier K<sup>+</sup> channel subunit Kir 5.1 in a mammalian reproductive system. *FEBS Lett.* 23;449(2-3):146-52. doi: 10.1016/s0014-5793(99)00420-2.

Santi, M., Santos, T., Hernández-Cruz, A., Darszon, A. (1998). Properties of a novel pH-dependent Ca<sup>2+</sup> permeation pathway present in male germ cells with possible roles in spermatogenesis and mature sperm function. *The Journal of general physiology*, 112(1), 33–53. <https://doi.org/10.1085/jgp.112.1.33>

Serafini, G., Pompili, M., Innamorati, M., Giordano, G., Montebovi, F., Sher, L., Girardi, P. (2012). The role of microRNAs in synaptic plasticity, major affective disorders and suicidal behavior. *Neuroscience research*, 73(3), 179-190.

Sherman Horev, H., Rabinowitz, K. M., Elad, H., Barkan, R., Ben-Shachar, S., Pasmanik Chor, M., & Dotan, I. (2018). Increase in processing factors is involved in skewed microRNA expression in patients with ulcerative colitis who develop small intestine inflammation after pouch surgery. *Inflammatory Bowel Diseases*, 24(5), 1045-1054.

Shivdasani, A. (2006). MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood*. Dec 1;108(12):3646-53.

Solek, P., Mytych, A., Tabeck, M., Sowa, M., Kozirowski, J. (2021). Toxic effect of antidepressants on male reproductive system cells: evaluation of possible fertility reduction mechanism. *J Physiol Pharmacol*; 72(3).

Stahl, M. (2002). *Psychopharmacologie essentielle*. Paris: Flammarion, 433.

Stein, D. (1981). *The Effect of Various Chemical Compounds on Golden Hamster Sperm-Egg Interaction In Vitro*. The University of Manchester (United Kingdom).

Sullivan, R., Crane, W., Damjanoska, J., Carrasco, A., D'Souza, N., García, F., Van de Kar, D. (2005). Tanspirone activates neuroendocrine and ERK (MAP kinase) signaling pathways specifically through 5-HT<sub>1A</sub> receptor mechanisms in vivo. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology*, 371(1), 18–26.

Sullivan, R., Légaré, C., Lamontagne, J., Breton, S., Soulet, D. (2019). Revisiting structure/functions of the human epididymis. *Andrology*, 7(5), 748–757.

Sun, H., Zhu, Y., Wang, L., Liu, L., Ling, Y., Li, L., Sun, B., (2017). The Catsper channel and its roles in male fertility: a systematic review. *Reprod Biol Endocrinol*. 15;15(1):65. doi: 10.1186/s12958-017-0281-2.

Tang, R., Li, L., Zhu, D., Hou, D., Cao, T., Gu, H., Zen, K. (2012). Mouse miRNA-709 directly regulates miRNA-15a/16-1 biogenesis at the posttranscriptional level in the nucleus: evidence for a microRNA hierarchy system. *Cell research*, 22(3), 504-515.

Tanrikut, C., Schlegel, N. (2007). Antidepressant-associated changes in semen parameters. *Urology* 69 185 e185-187.

Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., Nakagama, H. (2007). Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(39), 15472-15477.

Thomas, T., Madhuri, H., Simrat, S., Kaushal, S., Monisha, K., Lippman, S. (2001). What if Depressed and Pregnant? *ychiatr Danu*. 2021 Summer;33(2):147-151.

Tian, C., Li, Z., Yang, Z., Huang, Q., Liu, J., Hong, B. (2016). Plasma MicroRNA-16 Is a Biomarker for Diagnosis, Stratification, and Prognosis of Hyperacute Cerebral Infarction. *PloS one*, 11(11), e0166688.

Valinezhad, A., Safaralizadeh, R., Kazemzadeh-Bavili, M. (2014). Mechanisms of miRNA-mediated gene regulation from common downregulation to mRNA-specific upregulation. *International journal of genomics*.

Vega, E., Rudolph, I., (2002). Characterization of oxytocin receptors and serotonin transporters in mast cells. *Endocrine*. 2002;18:167–172.

Vesga, O., Blanco, C., Keyes, K., Olsson, M., Grant, F., Hasin, S. (2008). Psychiatric disorders in pregnant and postpartum women in the United States. *Arch Gen Psychiatry* 2008; 65:805.

Vieira, L., Hamada, Y., Gonzaga, I., Bacchi, D., Barbieri, M., Moreira, G., Mesquita, de F., Gerardin, C. (2013). Could maternal exposure to the antidepressants fluoxetine and St. John's Wort induce long-term reproductive effects on male rats? *Reprod. Toxicol.* 35:102-7. doi: 10.1016/j.reprotox.2012.07.006.

Vijayakumar, M., Meti, L. (1999). Alterations in the levels of monoamines in discrete brain regions of clomipramine-induced animal model of endogenous depression. *Neurochemical research*, 24, 345-349.

Vogel, G., Hartley, P., Neill, D., Hagler, M., Kors, D. (1988). Animal depression model by neonatal clomipramine: reduction of shock induced aggression. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*, 31(1), 103–106.

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

Wilson M, Tripp J. (2022) Clomipramine. [En línea][Recuperado el 07 de mayo del 2024][Disponible en: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK541006/#>].

Wyrobek, J., Wavchmaker, G., Gordon, I., (1984). Sperm morphology testing in mice. In: Kilbey BJ, Nichol M, Ramel C. (Eds.), *Handbook of Mutagenicity Test Procedures*. Elsevier Science Amsterdam. pp. 739-750.

Xia, Z., Bergstrand, A., DePierre, W., Nässberger, L. (1999). The antidepressants imipramine, clomipramine, and citalopram induce apoptosis in human acute myeloid leukemia HL-60 cells via caspase-3 activation. *J Biochem Mol Toxicol*. 1999a;13(6):338-47. doi: 10.1002/(sici)1099-0461(1999)13:6<338::aid-jbt8>3.0.co;2-7. PMID: 10487422.

Zaki, B., Abulsoud, I., Ashraf, A., Abdelmaksoud, M., Sallam, A. M., Aly, H., Doghish, S. (2024). The potential role of miRNAs in the pathogenesis of schizophrenia-A focus on signaling pathways interplay. *Pathology-Research and Practice*, 155102.

Zhao, W., Ma, B., Tian, Z., Han, H., Tang, J., Dong, B., An, G., Cao, B., Wang, B. (2021). Inhibiting CBX4 efficiently protects hepatocellular carcinoma cells against sorafenib resistance. *Br J Cancer*. 2021 Mar;124(7):1237-1248. doi: 10.1038/s41416-020-01240-6. Epub 2021 Jan 21. PMID: 33473171; PMCID: PMC8007794.

Zhao, Y., Zhu, C., Chang, Q., Peng, P., Yang, J., Liu, C., Liu, Y., Chen, X., Liu, Y., Cheng, R., Wu, Y., Wu, X., Hu, L., Yin, J. (2020). MiR-424-5p regulates cell cycle and inhibits proliferation of hepatocellular carcinoma cells by targeting E2F7. *PLoS One* Nov 17;15(11):e0242179. doi: 10.1371/journal.pone.0242179. PMID: 33201900; PMCID: PMC7671513.

Zheng, W., Zhang, S., Chen, X., Jiang, S., Li, Z., Li, M. (2021). Case Report: Dendritic Cells and Macrophages Capture Sperm in Chronically Inflamed Human Epididymis. *Frontiers in immunology*, 12, 629680.

Zhou, R., Wu, J., Liu, B., Jiang, Y., Chen, W., Li, J., He, Q., He, Z. (2019). The roles and mechanisms of Leydig cells and myoid cells in regulating spermatogenesis. *Cellular and molecular life sciences: CMLS*, 76(14), 2681–2695.



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

# ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00125

Matricula: 2213800850

EFFECTO DEL TRATAMIENTO POSTNATAL CON CLOMIPRAMINA SOBRE LA CALIDAD ESPERMÁTICA Y LA EXPRESIÓN DE COMPONENTES DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN EL EPIDÍDIMO DE RATAS WISTAR.

En la Ciudad de México, se presentaron a las 12:00 horas del día 17 del mes de mayo del año 2024 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

- DRA. OFELIA LIMON MORALES
- DRA. IRMA JIMENEZ MORALES
- DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA
- DR. JOEL HERNANDEZ RODRIGUEZ

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:



MAESTRO EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

DE: DAVID YOAB ELIZALDE JAIMES

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

APROBAR

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó al interesado el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.


DAVID YOAB ELIZALDE JAIMES  
ALUMNO

REVISÓ



MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

DIRECTOR DE LA DIVISIÓN DE CBS




DR. JOSE LUIS GOMEZ OLIVARES

PRESIDENTA



DRA. OFELIA LIMON MORALES

VOCAL



DRA. IRMA JIMENEZ MORALES

VOCAL



DR. DANIEL ADRIAN LANDERO HUERTA

SECRETARIO



DR. JOEL HERNANDEZ RODRIGUEZ