



Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD IZTAPALAPA

DIVISIÓN DE CIENCIA BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD

MAESTRÍA EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN ANIMAL

EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN Y CALIDAD ESPERMÁTICA EPIDIDIMARIA EN  
RATAS MACHO ADULTAS EXPUESTAS A FLUOXETINA DURANTE LA GESTACIÓN  
Y LACTANCIA

TESIS

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

PRESENTA

BIOL. EXP. KARINA HERNÁNDEZ SANTIAGO

DIRECTORA

DRA. HERLINDA BONILLA JAIME

ASESORAS

DRA. EDITH ARENAS RÍOS

DRA. IRMA JIMÉNEZ MORALES

Ciudad de México, 28 enero 2019

## COMITÉ TUTORAL

Directora

**Dra. Herlinda Bonilla Jaime**

Profesor - Investigador Titular C

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

[bjh@xanum.uam.mx](mailto:bjh@xanum.uam.mx)

Asesora

**Dra. Edith Arenas Ríos**

Profesor – Investigador Titular C

Departamento de Biología de la Reproducción

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

[editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)

Asesora

**Dra. Irma Jiménez Morales**

Profesor - Investigador Titular C

Departamento de Ciencias de la Salud

Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa

[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.mx)

## **MIEMBROS DEL JURADO**

### **Dra. Edith Arenas Ríos**

Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  
[editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)

### **Dra. Irma Jiménez Morales**

Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  
[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.mx)

### **Dra. Tania Molina Jiménez**

Facultad de Q.F.B y Biología  
Universidad Veracruzana  
[tamoji05@gmail.com](mailto:tamoji05@gmail.com)

### **Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón**

Departamento de Biología  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  
[ahiezer@xanum.uam.mx](mailto:ahiezer@xanum.uam.mx)

La Maestría en Biología de la Reproducción Animal de la Universidad Autónoma Metropolitana, pertenece al Programa Nacional de Posgrados de Calidad (PNPC) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Registro de la MBRA ante CONACYT: 003797.

La Alumna Karina Hernández Santiago recibió apoyo del CONACyT, mediante el otorgamiento de una beca económica durante todo el tiempo de duración de los estudios en el posgrado. Número de registro CVU: 796021

Los integrantes del jurado, designado por la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Iztapalapa, aprobaron la presente tesis titulada "**Evaluación de la maduración y calidad espermática epididimaria en ratas macho adultas expuestas a fluoxetina durante la gestación y lactancia**". El examen se realizó el día 28 de enero de 2019



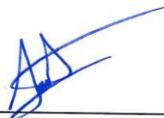
---

Presidente  
**Dra. Edith Arenas Ríos**  
Departamento de Biología de la Reproducción  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  
[editharenas2000@yahoo.com.mx](mailto:editharenas2000@yahoo.com.mx)



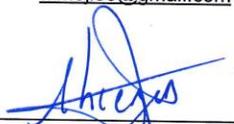
---

Secretario (a)  
**Dra. Irma Jiménez Morales**  
Departamento de Ciencias de la Salud  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  
[jimi@xanum.uam.mx](mailto:jimi@xanum.uam.mx)



---

Vocal  
**Dra. Tania Molina Jiménez**  
Facultad de Q.F.B y Biología  
Universidad Veracruzana  
[tamoji05@gmail.com](mailto:tamoji05@gmail.com)



---

Vocal  
**Dr. Ahiezer Rodríguez Tobón**  
Departamento de Biología  
Universidad Autónoma Metropolitana – Iztapalapa  
[ahiezer@xanum.uam.mx](mailto:ahiezer@xanum.uam.mx)

*La vida está diseñada para ser una historia de logros a pesar de la adversidad, porque en ausencia de la adversidad, los logros no podrían existir*

*-Jim Rohn*

## DEDICATORIA

Llena de alegría, amor y esperanza dedico este trabajo de investigación a mis padres **Martín** Hernández Castillo y **Yolanda** Santiago Ramírez por darme su amor, confianza y apoyo incondicional en todas las decisiones que he tomado, sus enseñanzas me han llevado a ser la persona que soy hoy en día. Su amor me inspiró a ser valiente y siempre ponerme retos, uno de los cuales, el día de hoy se ha cumplido.

A mis hermanos **Karla** y **José Martín** por su compañía y apoyo durante este trayecto.

A mi pareja **Erik** Leonardo Martínez Olivos quien se convirtió en mi fortaleza, que con su paciencia y amor me ha ayudado a levantarme en los momentos difíciles, impulsándome a seguir adelante, sin perder de vista lo importante.

Con todo mi amor les agradezco que estén siempre a mi lado

## AGRADECIMIENTOS

El día de hoy concluye una etapa más en mi vida, por lo que quiero compartir el término de este trayecto con todas esas personas que me han acompañado y de alguna manera influyeron en la persona que soy hoy en día, y que, además, sus consejos, regaños y compañía contribuyeron a que pudiera llevar acabo la finalización de este proyecto.

Agradezco a la **Dra. Herlinda Bonilla Jaime** quien hace 6 años me acepto en su laboratorio para realizar mi servicio social, gracias por su paciencia, apoyo y sobre todo por compartir sus conocimientos conmigo, tanto en el ámbito profesional como personal. Estos años formando parte de su equipo de trabajo han sido de gran aprendizaje, gracias por creer en mí y en que podría completar este proyecto.

A la **Dra. Edith Arenas Ríos** gracias por el tiempo otorgado, por compartir sus conocimientos conmigo, por brindarme el apoyo y la guía necesaria para culminar este proyecto, y por la paciencia otorgada con cada una de las fallas que tuve.

A la **Dra. Irma Jiménez Morales** gracias por su asesoría, puntos de vista y conocimientos que ayudaron a enriquecer este proyecto para su culminación exitosa

A mi compañero **Joel Hernández Rodríguez** quien me escucho, me aconsejo y me asesoro tanto en el ámbito académico como personal y que, además, se convirtió en un gran amigo.

A la **Dra. Ana Laura López López, la Dra. Malinalli Brianza Padilla y la Dra. Ofelia Limón Morales** que alguna vez formaron parte de este grupo de trabajo y que contribuyeron de manera notable en mi formación, gracias por brindarme consejos y compartir su experiencia conmigo.

A **Yumara Lee Pérez Bautista, Ma. de los Ángeles Manzano Hernández , Pablo López de Jesús y Maribel Estévez** por los momentos compartidos, los consejos, la ayuda otorgada y la gran amistad que hemos formado.

A **Flor, Brenda y Antonia** amigas desde la licenciatura y a todos mis amigos que siempre me han acompañado en este trayecto y que no he mencionado muchísimas gracias.

## INDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>RESUMEN</b> .....	3
<b>ABSTRACT</b> .....	4
<b>1. Introducción</b> .....	<b>5</b>
1.1. Eje Hipotálamo- Hipófisis- Gónada (HHG).....	7
1.2. Diferenciación de la gónada .....	8
1.3. Testículo .....	9
1.4. Epidídimo .....	10
1.4.1. Diferenciación del epidídimo.....	10
1.4.2. Estructura del epidídimo .....	11
1.4.3. Tipos celulares del epidídimo .....	12
1.4.4. Funciones del epidídimo .....	16
1.4.4.1. Transporte de espermatozoides .....	17
1.4.4.2. Maduración espermática epididimaria .....	17
1.4.4.3. Almacenamiento del espermatozoide.....	24
1.4.5. Regulación hormonal del epidídimo .....	24
1.5. Serotonina (5-HT) .....	25
1.5.1. 5-HT y su participación en funciones reproductivas .....	27
1.5.2. 5-HT en el desarrollo .....	28
1.6. Fluoxetina (FLX) .....	30
1.6.1. Mecanismo de acción .....	30
1.6.2. Farmacocinética .....	31
1.7. Efecto de la administración de ISRS durante la etapa perinatal .....	32
<b>2. Antecedentes</b> .....	<b>34</b>
2.1. Efecto de la FLX sobre la conducta sexual masculina y parámetros testiculares .....	34
<b>3. Justificación</b> .....	<b>36</b>
<b>4. Pregunta de Investigación</b> .....	<b>37</b>

<b>5. Hipótesis</b> .....	<b>37</b>
<b>6. Objetivos</b> .....	<b>37</b>
6.1. Objetivo general .....	37
6.2. Objetivos particulares .....	37
<b>7. Material y métodos</b> .....	<b>38</b>
7.1. Concentración de Testosterona (T) .....	39
7.2. Obtención de los espermatozoides .....	40
7.3. Calidad espermática .....	40
7.4. Compactación de DNA con azul de anilina (AB) .....	42
7.5. Distribución de carbohidratos .....	43
<b>8. Análisis Estadístico</b> .....	<b>44</b>
<b>9. Resultados</b> .....	<b>44</b>
9.1. Concentración de testosterona .....	44
9.2. Parámetros de calidad espermática .....	45
9.3. Evaluación de la distribución de carbohidratos en la membrana del espermatozoide en las distintas regiones del epidídimo.....	48
9.3.1. Unión de <i>Concanavalia ensiformis aglutinina</i> (Con A) a residuos de manosa .....	48
9.3.2. Unión de <i>Triticum vulgare aglutinina</i> (WGA) a residuos de N- acetilglucosamina y ácido siálico .....	52
<b>10. Discusión</b> .....	<b>56</b>
<b>11. Conclusión</b> .....	<b>69</b>
<b>12. Perspectivas</b> .....	<b>69</b>
<b>13. Referencias</b> .....	<b>69</b>

## ABREVIATURAS

<b>µg:</b> Microgramo	<b>GnRH:</b> Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>µL:</b> Microlitro	<b>hCG:</b> Gonadotropina coriónica humana
<b>5-HT:</b> Serotonina	<b>HHA:</b> Eje Hipotálamo - Hipófisis- Adrenal
<b>5-HTP:</b> 5-Hidroxitriptofano	<b>HHG:</b> Hipotálamo – Hipófisis - Gónada
<b>AB:</b> Azul de anilina	<b>HHT:</b> Hipotálamo – Hipófisis -Testículo
<b>ABP:</b> Proteínas unidoras de andrógenos	<b>IMAO:</b> Inhibidores de la monoamino oxidasa
<b>AG:</b> Aparato de Golgi	<b>ISRS:</b> Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina
<b>AMH:</b> Hormona Antimülleriana	<b>JAC:</b> Jacalin, de <i>Artocarpus integrifolia</i>
<b>ANOVA:</b> análisis de varianza	<b>KNDy:</b> Kisspeptinas que co-expresan NKB y Dyn
<b>Arg:</b> Arginina	<b>LCA:</b> <i>Lens culinaris</i>
<b>ASF:</b> Factor estabilizante del acrosoma	<b>LH:</b> Hormona Luteinizante
<b>Asn:</b> Asparagina	<b>Lys:</b> Lisina
<b>CG:</b> Células germinales	<b>NA:</b> Noradrenalina
<b>CGP:</b> Células germinales primordiales	<b>NAA1:</b> <i>Maackia amurens aglutinina</i>
<b>CMI:</b> Clomipramina	<b>NKB:</b> Neurokinina B
<b>ConA:</b> <i>Concanavalia Ensiformis Aglutinina</i>	<b>nm:</b> nanómetros
<b>CRH:</b> Hormona liberadora de corticotropina	<b>NO:</b> Óxido nítrico
<b>Cys:</b> Cisteína	<b>OMS:</b> Organización Mundial de la Salud
<b>DA:</b> Dopamina	<b>PAF:</b> Paraformaldehído
<b>DBA:</b> <i>Dolichos biflorus aglutinina</i>	<b>pb:</b> Pares de bases
<b>DHT:</b> 5-α-dihidrotestosterona	<b>PBS:</b> Buffer de fosfatos´
<b>Dyn:</b> Dinorfina	<b>pCPA:</b> cholophenyalanine
<b>EEM:</b> Error estándar de la media	<b>PEA:</b> <i>Pisum sativum</i>
<b>ERA:</b> Elementos de respuesta a andrógenos	<b>PNA:</b> <i>Arachis hipogae</i>
<b>FICT:</b> Isotiocianato de fluoresceína	<b>RA:</b> Receptor de andrógenos
<b>FSH:</b> Hormona folículo estimulante	<b>RE:</b> Retículo endoplásmico
<b>FXL:</b> Fluoxetina	<b>Ser:</b> Serina

**SERT:** Transportador de serotonina

**SNA:** *Sambucus nigra aglutinina*

**SNC:** Sistema nervioso central

**S-S:** Puente disulfuro

**T:** Testosterona

**Thr:** Treonina

**Tnp:** Proteínas de transición

**TPH:** Triptófano hidroxilasa

**VAA:** *Viscum álbum aglutinina*

**WGA:** *Triticum vulgare*

**Zn<sup>2+</sup>:** Zinc

## RESUMEN

Las mujeres embarazadas y lactantes son susceptibles a padecer depresión, por lo que muchas veces requieren de terapia farmacológica. Entre los fármacos de primera elección se utiliza la fluoxetina (FLX), el cual es capaz de atravesar la barrera hemato-placentaria y ha sido detectada en la leche materna. Los estudios sobre los efectos de la FLX administrada en etapas perinatales sobre los aspectos reproductivos de la descendencia han sido poco explorados en humanos. En investigación básica usando roedores, se ha observado que la administración perinatal de 20mg/kg de FLX vía intragástrica mostró una disminución en la concentración de espermatozoides y de T a los 90 días de edad, sin embargo, no existen datos que evalúen como afecta las funciones del epidídimo, órgano donde los espermatozoides sufren una serie de modificaciones post-testiculares que les provee de su capacidad fertilizante; entre estas modificaciones destacan los cambios en los carbohidratos de la membrana plasmática como son manosa, N-acetilglucosamina y ácido siálico, los cuales están involucrados en el reconocimiento e interacción entre gametos masculino y femenino, y posteriormente la fertilización, además en el epidídimo se lleva a cabo la hiper-compactación del DNA mediante la formación de puentes di-sulfuro, lo cual brinda mayor protección al material genético, contribuyendo de esta manera al mantenimiento de la calidad espermática. Por lo que, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la exposición de FLX durante la gestación y la lactancia sobre la maduración y calidad espermática, así como la concentración de T en ratas adultas. Se encontró que la FLX en una dosis de 20 mg/Kg no afecta la concentración de T, la compactación del DNA ni los parámetros de calidad espermática (concentración y viabilidad) para ninguna de las regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*), pero si muestra una disminución en el porcentaje de anomalías del flagelo (enrollado y doblado) del grupo tratado con FLX en espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo, también se encontró alteración en los patrones observados de los carbohidratos manosa y N-acetil glucosamina y/o ácido siálico en los espermatozoides obtenidos de las distintas regiones del epidídimo, por lo que la FLX a una dosis de 20 mg/Kg administrada en etapa perinatal no afecta la calidad espermática pero sí parece estar afectando la maduración espermática epididimaria en la edad adulta, lo que podría llegar a afectar la fertilidad, sin embargo, aún es necesario realizar más estudios.

## ABSTRACT

Pregnant and lactating women are susceptible to depression, so they often require pharmacological therapy. Among the first-line drugs, fluoxetine (FLX) is used, which is able to cross the blood-placental barrier and has been detected in breast milk. Studies on the effects of FLX administered in perinatal stages on the reproductive aspects of offspring have been little explored in humans. In basic research using rodents, it has been observed that perinatal administration of 20 mg / kg of FLX by oral route (gavage) showed a decrease in the concentration of sperm and T at 90 days of age, however, there aren't data to assess how it affects the functions of the epididymis, organ where the sperm undergo a series of post-testicular modifications that provide them with their fertilizing capacity; Among these modifications are the changes in carbohydrates of the plasma membrane such as mannose, N-acetylglucosamine and sialic acid, which are involved in the recognition and interaction between gametes and subsequently fertilization, in addition to the epididymis the hyper-compaction of DNA through the formation of di-sulfide bridges, which provides greater protection to the genetic material, thus contributing to the maintenance of sperm quality. Therefore, the objective of this work was to evaluate the effect of FLX exposure during pregnancy and lactation on maturation and sperm quality, as well as the concentration of T in adult rats. It was found that FLX at a dose of 20 mg / Kg doesn't affect T concentration, DNA compaction or sperm quality parameters (concentration and viability) for any of the epididymal regions (*caput*, *corpus* and *cauda*), but if it shows a decrease in the percentage of flagella abnormalities (rolled and folded) of the group treated with FLX in spermatozoa obtained from the caudal region of the epididymis, alteration was also found in the observed patterns of carbohydrates mannose and N-acetyl glucosamine and/or sialic acid in the spermatozoa obtained from the different regions of the epididymis, so that the FLX at a dose of 20 mg / Kg administered perinatally doesn't affect the sperm quality but does seem to be affecting epididymal sperm maturation in adulthood, which could affect fertility, however it is still necessary to carry out more studies.

## 1. Introducción

Los fármacos antidepresivos son utilizados para el tratamiento del estado de ánimo entre otros trastornos como la ansiedad. Su mecanismo de acción se enfoca en incrementar las aminas biogénicas como serotonina y/o noradrenalina. La primera generación de antidepresivos son los inhibidores de la monoaminoxidasa (IMAO); estos inhiben la degradación de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) (Bercovici, 2005; Feighner, 1999). Los de segunda generación comprenden los antidepresivos tricíclicos, estos inhiben la recaptura de noradrenalina y 5-HT. En los últimos años se han desarrollado compuestos más específicos que permiten bloquear exclusivamente la recaptura de 5-HT ó de NA. Este tipo de fármacos conforman la tercera generación y son llamados inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (ISRS), los cuales presentan menos efectos colaterales que los tricíclicos y los IMAO. Entre los más utilizados en la clínica encontramos a la fluoxetina (FXL) y el citalopram entre otros (Bercovici, 2005).

Los ISRS son fármacos que se utilizan durante el embarazo para el tratamiento de algunos trastornos como la depresión y la ansiedad. La mayoría de estos fármacos son transferidos al feto a través de la placenta. Se han detectado en la leche materna, por lo que, un número considerable de niños se ven expuestos a este tipo de fármacos durante la etapa neonatal y postnatal, etapas que resultan críticas para su desarrollo (Homborg et al., 2010).

La administración de ISRS durante el embarazo y lactancia, repercute en diferentes procesos fisiológicos, endocrinos y conductuales. En mamíferos las neuronas monoaminérgicas, son de gran importancia en diferentes procesos que incluyen la memoria, los estados de ánimo, regulación del sueño-vigilia entre otros, además, durante la gestación presentan un papel trófico sobre la morfogénesis cerebral (Verney et al., 2002). Son neurotransmisores que aparecen en el sistema nervioso central (SNC) en etapas tempranas y actúan como señales de proliferación, diferenciación, apoptosis celular, además del proceso de sinaptogénesis (Azmitia, 2001; Lauder, 2016; Verney et al., 2002). La 5HT se asocia con la formación de los circuitos neuronales relacionados con la conducta sexual y el desarrollo del

dimorfismo sexual en el cerebro (De Vries et al., 1984), esto debido a que antagoniza el efecto de la testosterona (T) neonatal sobre el cerebro, así como la función fisiológica y de comportamiento en la rata adulta (Murray et al., 2004), repercutiendo en el desarrollo de los órganos que conforman el aparato reproductor.

Existen algunos estudios sobre el desarrollo cerebral en ratas que han revelado que la exposición a antidepresivos ISRS en etapas tempranas del desarrollo, provoca alteraciones en la función de los sistemas de neurotransmisión y en especial en el sistema serotoninérgico, manteniendo los efectos hasta la edad adulta (Glover & Clinton, 2016; Millard et al., 2017).

Se ha propuesto que la serotonina (5-HT) regula el eje Hipotálamo- Hipófisis- Testículo (HHT). La participación de 5-HT dentro de la regulación del hipotálamo aún no es clara, sin embargo, diversos estudios han demostrado que en el hipotálamo, las neuronas productoras de GnRH reciben inervación del sistema serotoninérgico (Herbison, 2016; Pollak Dorocic et al., 2014) que modula la secreción de GnRH, y a su vez, GnRH estimula la secreción de las gonadotropinas, la FSH y la hormona LH, en la hipófisis, afectando de esta manera la producción espermática y la concentración de T (Wada et al., 2006). El eje HHT se diferencia y se desarrolla durante la gestación, influenciado por procesos neurales y hormonales (Beck-Peccoz et al., 1991; Magon & Kumar, 2012), los cuales pueden ser sensibles al tratamiento con FLX. Por otro lado, diversos reportes indican que, el tratamiento con FLX en el periodo perinatal en ratas (Bonilla-Jaime et al., 2003) induce disminución de las concentraciones de T, modificaciones en la conducta sexual y la espermatogénesis. La disminución en la T puede afectar, además de los órganos involucrados en el eje, sino también a los órganos andrógeno-dependientes, como el epidídimo, que se encarga de que los espermatozoides se maduren, es decir, que adquieran su capacidad para fertilizar al ovocito (Meistrich et al., 1975; Robaire & Hinton, 2015). Actualmente, no existen datos sobre los posibles efectos de la exposición a FLX en etapas perinatales sobre aspectos reproductivos en animales que han alcanzado la madurez sexual. Algunos estudios

han reportado ciertas anomalías a nivel de testículo, no obstante, se desconoce si la FLX pudiera estar afectando a otros órganos, como el epidídimo y que a su vez se encuentre afectando la capacidad reproductiva del macho mediante la alteración del eje HHG.

### **1.1. Eje Hipotálamo- Hipófisis- Gónada (HHG)**

El eje HHG es el regulador principal en la formación de gametos, y contrario a lo que se piensa, este eje pasa por un corto periodo de activación durante la etapa fetal y la etapa postnatal temprana, antes de ser activado definitivamente durante la pubertad del individuo; este breve periodo es conocido como “mini-pubertad” (Kuirin-Hänninen et al., 2014). Este periodo concuerda con el periodo de activación gonadal, donde existe un aumento en las concentraciones de la hormona luteinizante (LH). La concentración alta de LH promueve la producción de T, hormona que contribuye con las características sexuales secundarias y el comportamiento masculino (Barrio et al., 2015). Al finalizar este periodo, el eje HHG vuelve a su estado de reposo hasta su activación definitiva con la llegada de la pubertad.

Durante la adolescencia el eje HHG se activa, en el hipotálamo comienza la producción la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), molécula indispensable para el funcionamiento del eje (Prevot, 2015). Cabe destacar que los pulsos de GnRH se encuentra altamente regulados no solo por las hormonas que componen al eje, sino también por co-transmisores como la kisspeptina, la neuroquinina B (NKB) y la dinorfina (Dyn), las cuales forman el complejo KNDy (kisspeptinas que co-expresan NKB y Dyn) (Manfredi-Lozano et al., 2017). Por otro lado, la liberación de GnRH también puede ser controlada a través de diferentes neurotransmisores como la 5-HT, la NA, DA y el óxido nítrico (NO). Aunado a esto, se ha observado que, las inervaciones de 5HT pueden estimular o inhibir la producción y liberación de LH, claro está, que esto dependerá del área cerebral donde se ubican tales inervaciones (Safarinejad, 2008).

Una vez sintetizada la GnRH es liberada en el sistema porta-hipofisario para ejercer su acción en los gonadotropos de la hipófisis anterior, donde se une a su receptor GPR, que provoca la activación de la vía de fosfoinositol- 3-fosfato (Plant, 2015). Esta vía regula la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y de LH al torrente sanguíneo, las cuales ejercen su efecto sobre las células de Sertoli y las células de Leydig respectivamente, favoreciendo la formación de los espermatozoides y la producción de esteroides sexuales principalmente de la T, hormona que es indispensable para la regulación de diversos procesos reproductivos. La regulación negativa de la liberación de GnRH está dado por la concentración elevada de esteroides, LH y FSH (Redondo-Figuero & Viadero-Ubierna, 2008).

La producción de espermatozoides y de esteroides sexuales durante la edad adulta se encuentra ligado a que, durante la etapa fetal, se de una correcta diferenciación en la gónada.

## **1.2. Diferenciación de la gónada**

Durante las primeras semanas del desarrollo embrionario, las gónadas comienzan a desarrollarse a partir de la cresta genital. La cresta genital está compuesta por células germinales primordiales (CGP), las cuales migran desde el saco vitelino a través de la línea primitiva hasta llegar a la gónada bipotencial recién formada; y por las células somáticas, que en roedores, migran desde el epitelio celómico (Karl & Capel, 1998). La diferenciación de las células somáticas, en células de Sertoli o células de la granulosa, está determinada por la información genética del embrión conocida como diferenciación primaria (XY machos y XX hembras). Una vez diferenciadas dichas células, representan el soporte para que las gónadas puedan diferenciarse en testículos u ovarios (Karl & Capel, 1998; Tanaka & Nishinakamura, 2014).

La diferenciación de las células de pre-Sertoli se realiza gracias a la acción de un gen llamado SRY que se localiza en el cromosoma Y (Tanaka & Nishinakamura, 2014). La expresión del gen SRY promueve a su vez la expresión de SOX9 que permite la diferenciación de la gónada masculina al producir la hormona

antimülleriana (AMH), la cual a su vez inhibe el desarrollo del aparato reproductor femenino. Una vez activado el gen SOX9, las células pre-Sertoli rodean a las células germinales para formar los cordones testiculares; estos cordones se unen por ambos extremos a la *rete testis*, a este paso se considera decisivo en la diferenciación del testículo, pues los cordones formados darán origen a los túbulos seminíferos (Svingen & Koopman, 2013). En humanos, es a partir de la octava semana que las células de Leydig producen andrógenos los cuales son responsables de la estabilización de los conductos de Wolff y de su diferenciación en epidídimo, conducto deferente y vesículas seminales, así como de la masculinización del seno urogenital y de los genitales externos (Hiort, 2013; Knickmeyer & Baron-Cohen, 2006). La diferenciación de las células de Leydig, su proliferación y su actividad esteroidogénica dependen del estímulo gonadotrófico proporcionado por la gonadotropina coriónica humana (hCG) intrauterina en los primeros seis meses de vida, y de la LH hipofisaria en el último trimestre (Knickmeyer & Baron-Cohen, 2006)

### **1.3. Testículo**

El testículo es un órgano que lleva a cabo dos procesos importantes: la producción espermática y la esteroidogénesis. Éste último proceso, favorece el desarrollo, la diferenciación y la función sexual (Álvarez-González, 1989; Hafez & Hafez, 2013).

Las gónadas se encuentran situadas dentro de la bolsa escrotal, tienen forma ovoidea, y en la rata, suelen medir entre 20 mm de largo y 14 mm de diámetro, con un peso de entre 3-5 gr. Se encuentran envueltas por una membrana denominada túnica albugínea. Constituida por lóbulos testiculares, que contienen a los túbulos seminíferos. Dentro de los túbulos seminíferos se encuentran las células germinales (CG) que dan origen a los espermatozoides. Las células de Sertoli cuya función principal es brindar los elementos necesarios para que se lleve a cabo de manera correcta el proceso de espermatogénesis. Asimismo, en el espacio intersticial que está entre los túbulos seminíferos se ubican las células de Leydig, encargadas de la biosíntesis de hormonas esteroideas, principalmente de T,

hormona necesaria para el desarrollo de la espermatogénesis y la conducta sexual masculina (Álvarez-González, 1989; Fawcett & Herranz Rodríguez, 1994).

Una vez que la espermatogénesis se completa, se lleva a cabo la espermiación, donde los espermatozoides son liberados a la luz del túbulo seminífero, donde comienzan su traslado hacia el epidídimo.

#### **1.4. Epidídimo**

Cuando los espermatozoides son liberados al testículo, estos aún no han adquirido la capacidad para fertilizar al ovocito, característica que adquieren una vez que recorren el epidídimo. El epidídimo es un órgano que se encuentra adosado al testículo y se divide anatómicamente en 4 regiones principales: segmento inicial, *caput*, *corpus* y *cauda*.

##### **1.4.1. Diferenciación del epidídimo**

El epidídimo deriva de los conductos de Wolff durante la etapa fetal y su diferenciación está relacionada con la expresión de genes Hox y Pax, ya que sea visto que, los ratones KO para estos genes. muestran alteraciones morfológicas e incluso ausencia de desarrollo del epidídimo (Cornwall, 2008). En rata, al momento del nacimiento, el epidídimo pasa por tres fases para que se encuentre totalmente diferenciado: período indiferenciado, período de diferenciación y periodo de expansión (Robaire & Hinton, 2015; Sun & Flickinger, 1979). En la etapa postnatal temprana, el segmento inicial del *caput* y *corpus* han experimentado un enrollamiento mayor en comparación con la *cauda*. En los primeros días el tabique individual conjuntivo inicia la segmentación anatómica del epidídimo, junto con el crecimiento considerable del conducto. El epitelio es todavía indiferenciado y se caracteriza por la presencia de células columnares (Sun & Flickinger, 1979). En la etapa postnatal los cambios clave en el desarrollo del epidídimo son los siguientes: en el día 14, aparecen células halo; en el día 15, se observan células columnares y estrechas; en el día 28, las células columnares se diferencian en basales y principales; del día 36 en adelante, aparecen células estrechas y claras; y aproximadamente en el día 49 el epidídimo se encuentra totalmente diferenciado

presentando todas las células que lo caracterizan (células principales, halo, estrechas, basales, apicales y claras), ver Figura 1 (Robaire & Hinton, 2015). Por lo que, la diferenciación de éste órgano, se encuentra vulnerable en las etapas prenatal y postnatal. Por lo que la exposición en estos periodos a sustancias químicas o de otra índole puede alterar la función del epidídimo en etapa adulta.

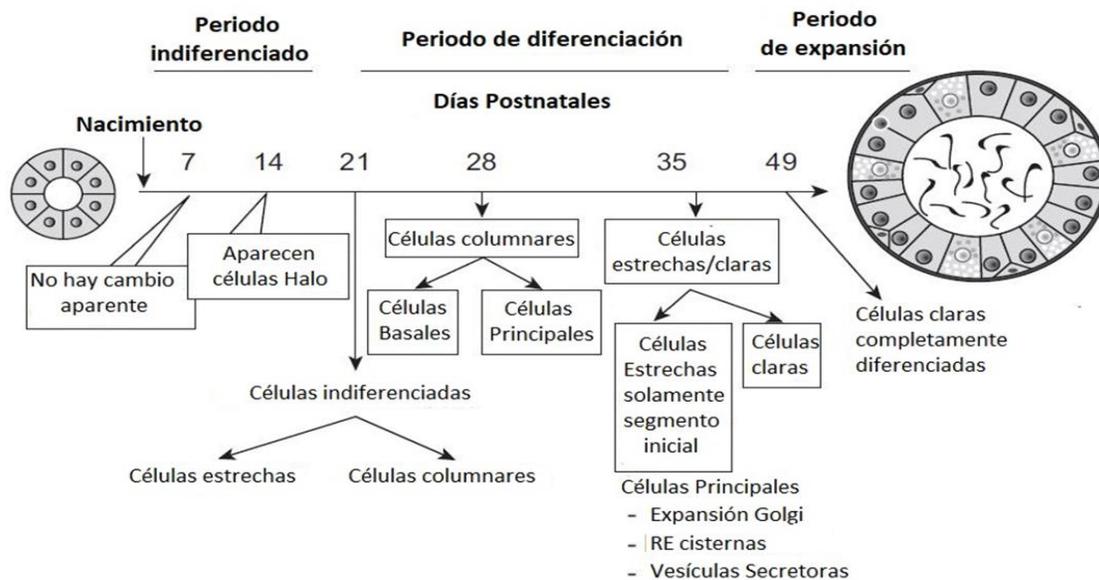


Figura 1. Diferenciación del epitelio epididimario en roedores desde el nacimiento hasta la edad adulta. Las células del epitelio permanecen indiferenciadas hasta el día 21 postnatal, donde comienzan a diferenciarse en células estrechas y columnares, estas a su vez dan origen a las células basales y principales en el día 28 postnatal. En el día 49, las células que conforman el tejido se encuentran completamente diferenciadas y funcionales. (Tomada y modificada de Robaire & Hinton, 2015).

#### 1.4.2. Estructura del epidídimo

El epidídimo es un órgano que está conformado por un tubo estrecho y alargado, que se encuentra adosado al testículo y conecta los conductos deferentes al reverso de cada testículo. Su longitud varía entre especies, en el humano puede llegar a medir hasta 6 m mientras que en la rata mide 3 m (Robaire & Hinton, 2015). Anatómicamente el epidídimo se divide en tres regiones principales: *caput*, *corpus* y *cauda*; en la rata se puede distinguir una cuarta región denominada *segmento inicial* (Figura 2A) (Robaire & Hinton, 2015; Sullivan & Mieusset, 2016). Histológicamente el epidídimo de la rata se encuentra regionalizado en 19

segmentos diferentes (Figura 2B); estos segmentos forman septos que se caracterizan por la creación de microambientes con perfiles de transcriptoma específicos a lo largo del epidídimo, donde el espermatozoide sufre diversas modificaciones post-traduccionales (Jelinsky et al., 2007; Johnston et al., 2005; Sullivan & Mieusset, 2016). Esta regionalización, se encuentra dada, además, por los tipos celulares que predominan en cada región. Por lo que, este órgano es responsable de que los espermatozoides, adquieran su movilidad y su capacidad fertilizante, es decir, que se lleve a cabo la maduración espermática a medida que atraviesan cada una de las regiones antes mencionadas (Gal Iglesias & Ares Luque, 2005; Hernández-Rodríguez, 2016).

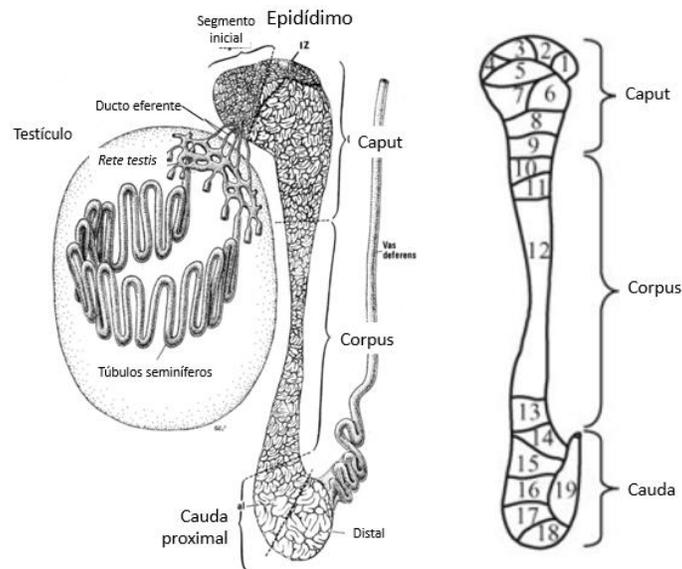


Figura 2. Esquema representativo del epidídimo de rata. (A) Regiones anatómicas: segmento inicial, caput, corpus y cauda. (B) Patrón esquemático de la segmentación epididimal (1-19). (Modificada de Jelinsky et al., 2007; Robaire & Hinton, 2015)

### 1.4.3. Tipos celulares del epidídimo

Como ya se mencionó, el epitelio del epidídimo se encuentra conformado por distintos tipos celulares (Figura 3) que recubren el epitelio del túbulo epididimario, las cuales se describen a continuación:

### a) Células principales

Las células principales son el tipo celular más abundante, se encuentran distribuidas a lo largo de todo el tubo epididimario, abarcando aproximadamente el 80% en las porciones proximales, porcentaje que disminuye en las zonas distales. Este tipo celular se caracteriza por poseer un aparato secretor y endocítico altamente desarrollado conformado por el retículo endoplásmico (RE), el aparato de Golgi (AG), y gránulos secretores (Hernández-Rodríguez, 2016; Robaire & Hinton, 2015; Zhou et al., 2018).

Las células principales son las responsables de sintetizar una gran cantidad de proteínas que pueden ser retenidas dentro de la célula o secretadas activamente en el compartimiento luminal del epidídimo (Robaire & Hinton, 2015). Se ha observado que en las porciones proximales del epidídimo (*caput y corpus*), las células principales reflejan una elevada actividad exocítica, mientras que en segmentos distales (*cauda*), este tipo celular refleja una actividad altamente endocítica, ya que, en esta región en particular, las células principales se encargan de la reabsorción de diversos contenidos del fluido epididimal (Zhou et al., 2018).

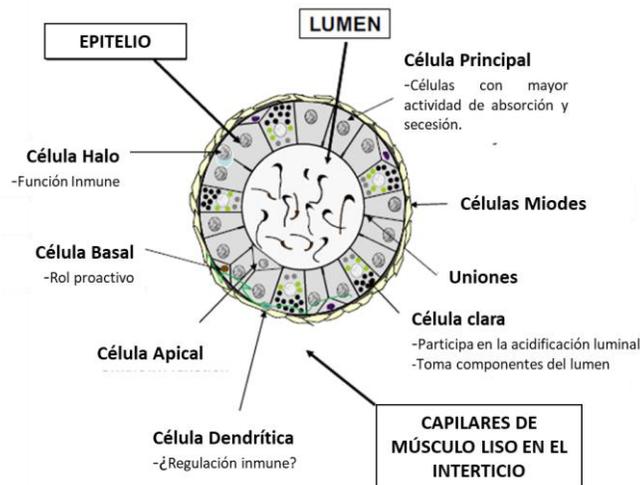


Figura 3. Organización esquemática de los principales tipos celulares en una sección transversal del epidídimo, se identifican las funciones principales asociadas con cada tipo de célula (tomado de Robaire & Hinton, 2015).

## b) Células claras

Las células claras se encuentran ampliamente distribuidas a lo largo de todo el tejido epididimario. Estas células se distinguen por que en su región apical contiene una gran variedad de vesículas, endosomas, lisosomas y cuerpos multivesiculares, así como algunas microvellosidades, todos ellos involucrados en la función endocítica. En la parte basal de las células claras se distingue su núcleo acompañado de una cantidad variable de gotas lipídicas (Robaire & Hinton, 2015; Zhou et al., 2018).

La maquinaria endocítica de este tipo celular es mayor al que contienen las células principales, por lo que son abundantes en la región de la cauda. Estas células se encuentran involucradas con la absorción de las gotas citoplasmáticas que son liberadas de los espermatozoides a medida que recorren el conducto epididimario, además de otros componentes lumbales (Hermo et al., 1988; Zhou et al., 2018). Otra de las funciones que se les ha atribuido a las células claras es la acidificación del lumen del epidídimo, esto gracias a que en su parte apical poseen elementos clave para llevar a cabo dicha acidificación entre los que se encuentra la V-ATPasa vacuolar, anhidrasa carbónica II y adenilato ciclasa soluble (ACs), destacando de esta manera su participación en la regulación del pH del entorno luminal (Robaire & Hinton, 2015; Shum et al., 2009; Zhou et al., 2018).

## c) Células basales

Las células basales se caracterizan por presentar una morfología hemisférica, se encuentran en contacto con la membrana basal del tubo epididimario y mantienen contacto con las células principales, se pensaba que, este tipo celular no tenía comunicación directa con la luz del túbulo epididimario (Hernández-Rodríguez, 2016; Robaire & Hinton, 2015). Sin embargo, se ha llegado a observar que en tejidos pseudoestratificados como lo es el epidídimo, algunas de las células basales pueden llegar a tener proyecciones que alcanzan la parte luminal (Shum et al., 2008). En la parte apical de las células basales se distinguen fosas recubiertas, así como gránulos de secreción sugiriendo de esta manera que estas células llevan a cabo procesos de endocitosis que involucran algunos factores derivados de la

sangre, regulando de manera parácrina a las células principales (Leung et al., 2004; Robaire & Hinton, 2015). Además, las células basales se han relacionado con la función inmune local, la regulación de electrolitos, del pH luminal y presión y volumen luminal (Leung et al., 2004; Robaire & Hinton, 2015; Shum et al., 2009; Zhou et al., 2018), los cuales son procesos estrechamente relacionados con la maduración y calidad espermática en el epidídimo.

#### d) Células apicales

La población células apicales en roedores, se encuentra localizada en el segmento inicial y la zona intermedia (*caput* y *corpus*) ocupando un 10% del epitelio celular en ellas, porcentaje que disminuye en la zona de la cauda del epidídimo llegando a penas al 1% (Adamali & Hermo, 1996). Las células apicales se distinguen por no entrar en contacto con la membrana basal, presentan un núcleo ovoide que se encuentra ubicado en la mitad superior del citoplasma celular y contienen una gran cantidad de mitocondrias (Adamali & Hermo, 1996; Robaire & Hinton, 2015). Se diferencian de las células estrechas por presentar un perfil de expresión de proteínas específico (Adamali & Hermo, 1996; Joseph et al., 2011; Robaire & Hinton, 2015). Sus funciones aún no están completamente claras, no obstante, se sabe que son capaces de endocitar sustancias provenientes de la luz del túbulo para su degradación, ya que cuenta con enzimas proteolíticas que permiten llevar a cabo dicho proceso (Robaire & Hinton, 2015).

#### e) Células estrechas

La ubicación de este tipo celular varía entre especies. En la rata y el ratón las células estrechas, al igual que las células apicales, se encuentran presentes en el segmento inicial y la zona intermedia, se ubican adyacentemente a las células principales distinguiéndose de ellas por ser más angostas, se atenúan y prolongan su citoplasma para alcanzar la membrana basal (Robaire & Hinton, 2015). En la parte apical de estas células se distinguen lisosomas, mitocondrias, numerosas vacuolas, vesículas endocíticas, las cuales se encuentran involucradas en la endocitosis y la secreción de iones H<sup>+</sup> en el lumen, su núcleo se encuentra ubicado

en la mitad superior del citoplasma (Adamali & Hermo, 1996; Hermo et al., 1988; Hernández-Rodríguez, 2016; Joseph et al., 2011; Robaire & Hinton, 2015).

Estas células, se distinguen de las células apicales debido a su aspecto morfológico y el perfil de expresión de proteínas, sugiriendo que participan en la degradación proteica dentro de los lisosomas, estas células brindan protección a los espermatozoides ante los diferentes microambientes que se encuentran presentes en el epidídimo, mediante la expresión de proteína como la glutatión-S-transferasa (GST), además de, la presencia de la anhidrasa carbónica II, lo que sugiere que estas células participan en la modificación del pH luminal, contribuyendo en la quiescencia de la movilidad espermática (Adamali & Hermo, 1996; Hermo et al., 2005; Joseph et al., 2011; Robaire & Hinton, 2015).

#### f) Células Halo

Las células halo están presentes en todo el epitelio del epidídimo, son células pequeñas que se distinguen por presentar un borde estrecho de citoplasma claro (Akabarsha et al., 2015), se localizan en la base del epitelio epididimario sin tocar la membrana basal y contienen una gran cantidad de gránulos que se distinguen por un núcleo denso. Se cree que forman una barrera inmunológica, por lo que se encuentran relacionadas con los linfocitos T auxiliares, linfocitos T citotóxicos y monocitos, por lo tanto, este tipo celular se considera como la célula inmunitaria primaria del epidídimo. Cabe resaltar que las células halo presentan un aumento en cada una de las regiones conforme el individuo envejece, además de la aparición de células eosinófilas (Akabarsha et al., 2015; Robaire & Hinton, 2015).

La estructura y el buen desempeño de las células que conforman el epitelio epididimal son importantes debido a que contribuyen a que el epidídimo realice sus funciones de forma adecuada, permitiendo la obtención de espermatozoides viables.

#### **1.4.4. Funciones del epidídimo**

El epidídimo cuenta con tres funciones principales, que son: 1) el transporte de espermatozoides, 2) la maduración espermática, la cual involucra el desarrollo de

la movilidad y la capacidad fertilizante mediante la creación de un entorno luminal especializado proporcionado por la actividad secretora y endocítica del epitelio epididimario y 3) el almacenamiento de espermatozoides.

#### **1.4.4.1. Transporte de espermatozoides**

Los espermatozoides son liberados de los túbulos seminíferos y son transportados a través de los conductos eferentes junto con el fluido testicular, esto debido a las contracciones de las células mioideas peritubulares y por el movimiento ciliar de las células epiteliales de los ductos eferentes (Rodríguez-Tobón, 2011). El tiempo en que, el espermatozoide tarda en recorrer el epidídimo, se encuentra influenciado por la frecuencia de eyaculación (Drobnis & Nangia, 2017) y a las contracciones musculares de la pared de musculo liso que se encuentra rodeando al túbulo epididimario (Drobnis & Nangia, 2017; Robaire et al., 2006).

En mamíferos, se han utilizados diversos métodos para evaluar el tiempo que los espermatozoides tardan en transitar el túbulo epididimario, destacando la marcación molecular del DNA, esto ha permitido observar el tiempo mínimo que tardan los espermatozoides en llegar a la parte caudal del epidídimo, otro de los métodos utilizados es el cálculo de los espermatozoides de reserva y la tasa de producción diaria de espermatozoides, gracias a estos métodos se ha estimado que el tiempo mínimo que tardan los espermatozoides en recorrer el túbulo epididimario es de 10 días, esto independientemente del tamaño del animal (Drobnis & Nangia, 2017; Robaire & Hinton, 2015).

#### **1.4.4.2. Maduración espermática epididimaria**

Una vez diferenciados, los espermatozoides no tienen la capacidad para moverse, ni para fecundar al ovocito, por lo que requieren de un proceso de maduración epididimaria, el cual se lleva a cabo a medida que los espermatozoides recorren las diferentes regiones del epidídimo (Dacheux et al., 2009), en donde presentarán una serie de modificaciones post-testiculares que se establecen al tener contacto con el microambiente del lumen epididimario, cabe resaltar que, la composición de este microambiente cambia de *caput* a *cauda*, favoreciendo que los cambios en el espermatozoide se lleven a cabo (Dacheux & Dacheux, 2013). Cuando los

espermatozoides llegan a la región de la *cauda* adquieren la capacidad para moverse progresivamente, y características que les permiten reconocer y unirse a la zona pelúcida, es decir, para fertilizar al ovocito (Sullivan & Mieusset, 2016). Entre estas características se incluyen cambios bioquímicos y estructurales, como son: la migración de la gota citoplasmática a lo largo del flagelo del espermatozoide, la remodelación del acrosoma, remodelación de la membrana plasmática y cambios en la cromatina entre otros (Bedford, 2015; Robaire & Hinton, 2015)..

Entre las funciones del epidídimo ligadas a la maduración del espermatozoide es el mantenimiento de la integridad del DNA y se concluye la compactación del DNA de los espermatozoides, este aspecto es considerado importante debido a que se encuentra directamente relacionado con la fertilidad masculina (González-Marín et al., 2012; Hernández-Rodríguez, 2016).

En las primeras etapas de la espermatogénesis, las espermatogonias y espermatoцитos tienen una cromatina igual que el de las células somáticas, es decir, el DNA se encuentra interactuando con proteínas nucleares conocidas como histonas, las cuales son ricas en residuos de lisina (Lys) y arginina (Arg), lo que favorece dicha interacción (Champroux et al., 2016). La unidad estructural de repetición básica de la cromatina se denomina nucleosoma, la cual consta de 147 pares de bases (pb) de DNA enrollados alrededor de un octámero de histonas, de esta manera el DNA adquiere una estructura que se asemeja a un “collar de perlas“, la histona H1 interactúa con la secuencia de DNA asociada a los nucleosomas permitiendo una mayor compactación de la cromatina (Champroux et al., 2016; Li & Zhu, 2015).

La cromatina del espermatozoide sufre cambios durante el proceso de espermatogénesis, ocasionando modificaciones en su núcleo, que se ve reflejado en una reducción nuclear de aproximadamente 1/7 de su volumen en comparación con el tamaño original del núcleo en una célula somática, lo que ocasiona a su vez una reducción de la cabeza del espermatozoide permitiendo así la adquisición de una cabeza más hidrodinámica que le proporciona una velocidad óptima y brinda

protección al DNA ante los diferentes ambientes que se ve expuesto (Andrabi, 2007; Champroux et al., 2016).

Para que esto ocurra, la cromatina se somete a una reorganización de las proteínas asociadas al DNA. En este proceso ocurren modificaciones en las histonas y la incorporación de algunas variantes de las mismas, las cuales permiten la apertura de la cromatina para el intercambio de histonas hiperacetiladas por proteínas de transición (Tnp), estas últimas proteínas pequeñas de entre 50-140 residuos de aminoácidos, tienen una carga más básica que las histonas y al igual que ellas son ricas Lys y Arg, actualmente se conocen 4 tipos de Tnp, pero solo Tpn1 y Tpn2 han sido estudiadas con mayor detalle, además se ha observado que se encuentran participando en la regulación transcripcional de la espermiogénesis (Martins et al., 2004; Patankar & Parte, 2017). El intercambio de las Tnp por las protaminas se da casi de inmediato y es llevado a cabo por modificaciones post-traduccionales entre los que destacan la hiperacetilación y la ubiquitinación facilitando el recambio de histonas a protaminas (Andrabi, 2007; Champroux et al., 2016).

Las protaminas son proteínas pequeñas (50 a 100 aminoácidos), que se caracterizan por ser básicas debido a que contienen hasta un 70% de Arg, forman complejos estables con el DNA y son eficientes para desplazar a las Tnp, además se ha sugerido que su alto contenido de Arg es importante para la remodelación de la cromatina una vez que se ha realizado la fertilización (Balhorn, 2007), además también son ricas en cisteínas (Cys). A diferencia con el enrollamiento de DNA-histona para la formación del nucleosoma, la protamina se enrolla a lo largo de la molécula de DNA: establece puentes electrostáticos intercatenarios en los residuos de Arg y los grupos fosfato del DNA, formando una estructura de toroide, donde el DNA forma bucles, aproximadamente con 500 pares de bases en la protamina por toroide, como ya se mencionó la mayor parte de esta condensación ocurre durante la espermatogénesis. Terminado este paso el espermatozoide queda inactivo transcripcionalmente (Balhorn, 2007; Hernández-Rodríguez, 2016; Silva & Gadella, 2006), sin embargo, en el epidídimo el espermatozoide sufre una hiper-compactación en el DNA, especialmente durante su tránsito en el segmento inicial y el *caput* del

epidídimo (Cooper & Ching-Hei, 2006), dicha compactación se debe a la formación de enlaces covalentes que forman puentes disulfuro (S-S) ocasionados por la oxidación de los grupos tiol (-SH) provenientes de las Cys ubicadas en los dominios amino y carboxilo de las protaminas, también existen enlaces no covalentes que resultan de la estabilización de los -SH por la presencia de Zinc ( $Zn^{2+}$ ) (Balhorn, 2007; Champroux et al., 2016; Hernández-Rodríguez, 2016). Existen diversas técnicas que pueden utilizarse para observar el estado de la cromatina espermática, evaluando distintos parámetros como la integridad, estabilidad y condensación, para esta última se ha hecho uso de algunos colorantes como el Azul de anilina (AB), el cual es un colorante ácido que presenta gran afinidad por las histonas ricas en Lys, por lo tanto los espermatozoides inmaduros obtendrán una coloración azul, mientras que los espermatozoides con cromatina compactada de manera correcta y que contienen protaminas con abundante Arg y Cys permanecen sin coloración, el estado del DNA se encuentra estrechamente relacionado con la fertilidad masculina, por lo que es uno de los parámetros evaluados para considerar a un espermatozoide funcional (Agarwal et al., 2016; Cooper & Ching-Hei, 2006).

Los cambios que ocurren en los espermatozoides a nivel de membrana plasmática a medida que avanza por el lumen del epidídimo es otra función importante de este órgano (Kuo et al., 2016; Marengo, 2008; Sostaric et al., 2008; Srivastava & Olson, 1991), estos cambios incluyen, la modificación en la composición de lípidos, glicoproteínas y la fosforilación en residuos de tirosina de las proteínas de la membrana plasmática,

En la membrana plasmática del espermatozoide, se encuentran fosfolípidos abundantes que son la fosfatidilcolina y la fosfatidiletanolamina, y en menor cantidad se encuentra la esfingomielina, fosfatidilserina y difosfatidilglicerol, además el colesterol también forma parte importante de ella (Hall et al., 1991; Pyttel et al., 2014).

Los cambios en el contenido de colesterol en el espermatozoide depende de la especie, en los roedores se ha observado que existe una disminución de aproximadamente el 50% (Awano et al., 1993; Hall et al., 1991; Rejraji et al., 2006),

esta disminución en el contenido de colesterol es proporcional a la modificación de fosfolípidos, dándole a la membrana mayor fluidez a medida que avanza por el epidídimo (Whitfield et al., 2015). La distribución del colesterol parece ser importante debido a que la membrana plasmática del espermatozoide presenta “balsas lipídicas” las cuales son microdominios enriquecidos con colesterol, dichas balsas modifican la dinámica de la membrana local, son esenciales para la transferencia regionalizada de proteínas al gameto masculino durante la maduración epididimaria (Whitfield et al., 2015).

Los espermatozoides de ratón y perro en la región del *caput*, muestran una membrana plasmática flexible, por lo que facilita la remodelación de lípidos, a medida que el espermatozoide avanza hacia el *corpus* y la *cauda*, la membrana plasmática del espermatozoide se estabiliza y se vuelve capaz de resistir los daños ocasionados por el ambiente luminal del epidídimo (Belleannee et al., 2011; Björkgren et al., 2015; Ramos Angrimani et al., 2017). Estos cambios se encuentran mediados por proteínas y algunos constituyentes lipídicos que se encuentran el fluido luminal del epidídimo, una vez terminada la maduración, la composición final de la membrana plasmática se distribuye en 70% de fosfolípidos, 25% colesterol y 5 % de glicolípidos, (Ramos Angrimani et al., 2017).

Una de las principales funciones del epidídimo es la secreción de proteínas que se adhieren a la membrana plasmática, entre ellas se encuentran los factores estabilizantes del acrosoma (ASF) también denominados “factores discapacitantes”. Estas moléculas evitan que los espermatozoides desarrollen una reacción acrosomal antes de tiempo, una vez que el espermatozoide se encuentra ubicado en el tracto femenino, dichas proteínas, comenzarán a ser removidas, por lo que la presencia o no de estos factores son determinantes para el poder fertilizante que tienen los espermatozoides (Fraser et al., 1990; Jiménez García & Merchant, 2003; Reynolds et al., 1989). Por otro lado, las proteínas presentes en el fluido luminal promueven modificaciones en la membrana plasmática del espermatozoide que, participan en la movilidad y en el reconocimiento del ovocito, además, influyen en la quiescencia espermática durante su almacenamiento en la *cauda* epididimaria, las proteínas

adquiridas durante en el proceso de maduración participan en la capacitación, la migración uterina, reconocimiento, unión y fertilización del ovocito (Hernández-Rodríguez, 2016).

Otra de las modificaciones post-transcripcionales que ocurren en el espermatozoide durante su tránsito por las diferentes regiones del epidídimo es la modificación de glicoproteínas, macromoléculas que se componen por un esqueleto peptídico con una o más cadenas de glicanos unidos de manera covalente, que se clasifican en 2 tipos principales dependiendo del tipo de enlace glucosídico: Los  $\beta$ -O glicosídicos son aquellos que se unen a el grupo  $-OH$  de aminoácidos como serina (Ser) y treonina (Thr) y los enlaces N- glicosídicos son aquellos enlaces que se forman con el grupo  $-NH_2$  de la asparagina (Asn) (Spiro, 2002; Tulsiani, 2006).

Durante la maduración espermática epididimaria se requiere de una serie de modificaciones en la distribución de las glicoproteínas o glicolípidos, para ello se ha demostrado la participación de dos tipos de enzimas (1) las glicohidasas las cuales se encargan de romper los glucoconjugados existentes y (2) las glicosiltransferasas las cuales son una clase de enzimas que transfieren residuos de azúcar a un sitio aceptor (Tulsiani, 2006). Estas enzimas se encuentran activas a un pH neutro por lo que son funcionales a un pH fisiológico como el que presenta el lumen del túbulo epididimario, que es de 6.8 (Levine & Kelly, 1978; Tulsiani, 2006).

Actualmente existen técnicas que permiten observar el comportamiento de los oligosacáridos que se encuentran presentes unidos a las proteínas o lípidos de la membrana plasmática, como la inmunohistoquímica (anticuerpos monoclonales y policlonales), o mediante el marcaje con lectinas conjugadas a fluorocromos que permiten la visualización, redistribución y modificación de los componentes de la superficie celular (Lee & Damjanov, 1984).

Las lectinas son proteínas que tienen la capacidad de reconocer carbohidratos específicos que se encuentren en la superficie celular, poseen dos sitios de reconocimiento (confiriéndole de esta manera una capacidad aglutinante) para estas moléculas, sin embargo, existen lectinas que son específicas para algunos carbohidratos, cabe resaltar que las lectinas no poseen actividad enzimática y

tampoco son productos de la respuesta inmune (Cruz et al., 2005; Hernández-Rodríguez, 2016). Las lectinas de origen vegetal se pueden clasificar por el monosacárido que es capaz de inhibir su capacidad aglutinante y por los oligosacáridos que reconocen (N-glicanos y O-glicanos) (Cruz et al., 2005; Micucci and Camps, 1987).

El uso de lectinas ha permitido determinar la presencia de los glicoconjugados, los cuales presentan diferentes patrones de tinción, esto ha permitido el marcaje de espermatozoides y la distinción de las diferentes regiones epididimarias gracias a las células epiteliales que presenta en cada una de ellas (Lee & Damjanov, 1984; Tajiri et al., 2012). La identificación de los residuos de azúcares con el uso de lectinas permite evaluar el estado funcional del espermatozoide, así como la distribución que tienen a lo largo del mismo. Lee & Damjanov, (1984) observaron la presencia de ciertos azúcares en el espermatozoide del ratón al final de la espermatogénesis, los cuales fueron evaluados por medio de lectinas específicas: *Triticum vulgare* (WGA) para N-acetil- D-glucosamina, *Lens culinaris* (LCA) y *Pisum sativum* (PEA) para D-glucosa y *Maclura pomífera* (MPA) para D-galactosa mostrando que los espermatozoides de ratón presentaron dichos carbohidratos en la superficie, además, proponen que estos azúcares se modifican cuando comienza su paso por el lumen del epidídimo.

Uno de los carbohidratos que se encuentra presente en la membrana plasmática de los roedores es la manosa, cuya función es conferirle flexibilidad al espermatozoide, lo cual es importante para poder activar la movilidad, además, durante la interacción con el ovocito sirve como el sitio del receptor de la zona pelúcida (Aliabadi et al., 2013; Mori et al., 1989). En la rata, el tránsito de los espermatozoides por el *caput* y la *cauda* del epidídimo presenta diferencias en los patrones de manosa cuando se evalúan mediante el uso de *Concanavalina ensiformis aglutinina* (Con A), mostrando en el *caput* muestran una distribución uniforme, mientras que los espermatozoides que se localizan a nivel de la *cauda* muestran áreas restringidas de unión de Con A con su azúcar correspondiente, en la cabeza y el flagelo (Olson & Danzo, 1981).

Otro de los carbohidratos presentes en la membrana plasmática de los espermatozoides es el ácido siálico, el cual provoca un incremento en la carga negativa en la superficie del espermatozoide, los espermatozoides del *caput* del epidídimo muestran una carga negativa baja, la cual aumenta conforme pasa por el *corpus* y la *cauda* (Holt, 1980; Tulsiani et al., 1993). N-acetilglucosamina y el ácido siálico son sensibles a la lectina WGA, por lo que en diferentes especies la unión de WGA puede observarse en la región acrosomal del espermatozoide y la mayor incorporación de ellos se lleva a cabo en la región del *corpus* (Kumar et al., 2009). N-acetilglucosamina, es un carbohidrato involucrado en la interacción de los gametos, la dispersión de las células de cúmulos, la unión y la penetración de la zona pelúcida, la reacción acrosomal y el bloqueo de la polispermia (Godknecht and Honegger, 1991; Prody et al., 1985; Zitta et al., 2006). Una vez que los espermatozoides han completado su maduración durante su tránsito por el ducto epididimario, se almacenan hasta que son eyaculados.

#### **1.4.4.3. Almacenamiento del espermatozoide**

Una vez que los espermatozoides alcanzan la región distal del corpus del epidídimo serán almacenados en la región caudal. Los cuales pueden ser almacenados por un periodo de más de 30 días, sin embargo, el periodo de almacenamiento también influye en la capacidad fertilizante, ya que cuanto más tiempo pasa, el espermatozoide comienza a ser susceptible a sufrir daños en la membrana y el DNA por efecto de un ambiente oxidante (Bedford, 2015; Robaire and Hinton, 2015) . Para que el epidídimo lleve a cabo las funciones antes mencionadas, es importante que cuente con una regulación hormonal adecuada.

#### **1.4.5. Regulación hormonal del epidídimo**

Benoit, (1926) demostró que la estructura y las funciones del epidídimo dependían de la presencia de una sustancia desconocida que provenía del testículo, años más tarde se identificó como T, por lo que, se determinó que este órgano es andrógeno-dependiente (Butenandt, 1931; Robaire & Hamzeh, 2011). A diferencia de otros órganos donde la T llega mediante el torrente sanguíneo, en el epidídimo, los

andrógenos provienen del fluido testicular, donde la T es transportada desde el testículo con ayuda de la proteína unidora de andrógenos (ABP), además la T se encuentra en concentraciones más elevadas que en el plasma, y se sabe que es de gran importancia para la elevada actividad secretora del segmento inicial y del *caput* (French et al., 1974; Robaire et al., 2006; Rodríguez-Tobón, 2011).

Cuando las células epiteliales captan la T esta es metabolizada a 5- $\alpha$ -dihidrotetosterona (DHT) mediante la enzima 5- $\alpha$ -reductasa, tanto la T como la DHT ejercen su acción mediante la unión al receptor para andrógenos (RA), el cual se encuentra ubicado en el citoplasma de las células (Hansson et al., 1974; Robaire & Hamzeh, 2011).

En el epidídimo el RA pertenece a la familia de receptores nucleares, una vez unida la T o la DHT, el RA se dimeriza modificando a los correceptores asociados, ya dimerizado se traslada al núcleo, donde actúa como un factor de transcripción para modular la expresión génica, además, el RA forma un homodímero que interactúa con elementos de respuesta a andrógenos (ERA) con lo cual se lleva a cabo la síntesis de proteínas en el retículo endoplásmico rugoso que permiten el mantenimiento y la funcionalidad del epidídimo (Davey & Grossmann, 2016; Hernández-Rodríguez, 2016; Robaire & Hamzeh, 2011).

A pesar de que el epidídimo es andrógeno-dependiente, existen otros factores que se encuentran regulando la funcionalidad de este órgano, como son los factores testiculares, los cuales se han propuesto como los responsables de la integridad del segmento inicial del epidídimo, estos factores llegan a este segmento mediante diferentes secreciones que son de origen lumicrino (Robaire et al., 2006; Rodríguez-Tobón, 2011), también se han propuesto que la regulación de algunas funciones específicas involucra la participación de otros elementos como los estrógenos, la progesterona, la prolactina, vitaminas, algunos neurotransmisores y factores de crecimiento (Robaire & Hamzeh, 2011).

Uno de los neurotransmisores propuestos en la regulación del epidídimo es la serotonina (5-HT), ya que esta, se encuentra participando en una amplia gama de procesos relacionados con la reproducción.

### **1.5. Serotonina (5-HT)**

La 5-HT es una monoamina que pertenece al grupo de las idolaminas, este neurotransmisor se encuentra presente en menor proporción en el SNC (1.2%) y en mayor proporción a nivel periférico (98%). A nivel periférico la 5-HT se encuentra en los pulmones, la piel, el hígado, corazón, testículo y epidídimo, que es captada por estos órganos mediante torrente sanguíneo (Feldman et al., 1997; Frungieri et al., 1999; Jimenez-Trejo et al., 2007).

La 5-HT a nivel de SNC es liberada por las neuronas serotoninérgicas, las cuales se ubican en el tallo cerebral, específicamente en los núcleos del rafé; este complejo está formado por nueve núcleos, de los cuales los núcleos del rafe dorsal y medial se encargan de producir el 80% de la 5-HT cerebral (Feldman et al., 1997; Hornung, 2003; Limón-Morales, 2011). Las proyecciones del rafé abarcan la mayor parte del SNC y funcionan como mediadores en la periferia. Es por ello que la 5-HT participa en diversos mecanismos fisiológicos y conductuales como la ingesta de alimento, el ciclo sueño-vigilia, la conducta sexual, la actividad motora, la atención y la memoria. Además, se encuentra estrechamente relacionada con el de ánimo y las emociones (Bear et al., 2016; Ciranna, 2006).

El triptófano es el aminoácido precursor de la síntesis de 5-HT; es un aminoácido esencial que se obtiene de la dieta (Palego et al., 2016). Una vez que el triptófano es transportado hasta el cerebro, las neuronas serotoninérgicas lo introducen para que pueda ser hidroxilado formando la 5- hidroxitriptofano. Dicha reacción es catalizada por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) y se considera como el paso limitante para la producción de 5-HT. Posteriormente ocurre una descarboxilación por la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (Feldman et al., 1997; Limón-Morales, 2011; Mohammad-Zadeh et al., 2008).

Una vez sintetizada la 5-HT, tiene que ser almacenada en vesículas y transportada por el axón hacia la hendidura sináptica, donde las vesículas son liberadas mediante un proceso de exocitosis. Cuando la 5-HT se encuentra en la hendidura sináptica, ejerce su acción al unirse a sus receptores. Los receptores se encuentran divididos en 7 grupos: 5-HT<sub>1-7</sub>, cada uno de ellos se subdivide en grupos y se encuentran ampliamente distribuidos en distintas partes del cuerpo (Feldman et al., 1997; Mohammad-Zadeh et al., 2008). Finalmente, cuando la 5-HT ha cumplido su función es metabolizada o recapturada por el transportador de 5HT (SERT), donde puede ser almacenada en vesículas o degradada por la enzima monoaminooxidasa (Feldman et al., 1997; Mohammad-Zadeh et al., 2008).

La 5-HT es un neurotransmisor importante ya que se ha observado que se encuentra participando en algunas funciones reproductivas.

#### **1.5.1. 5-HT y su participación en funciones reproductivas**

En la edad adulta, la 5-HT controla el libido y la conducta sexual, ambas inducidas a través del área preóptica medial del hipotálamo (Jimenez-Trejo et al., 2012). En el aparato reproductor masculino se ha reportado que la 5HT se encuentra presente en las células de Leydig, en el epidídimo y en las glándulas sexuales accesorias (Frungieri et al., 1999; Jimenez-Trejo et al., 2007). La función de la 5-HT sobre los tejidos reproductivos es limitada, se ha reportado que puede actuar como un modulador en la producción de T, y por lo tanto, regula la función endocrina de los testículos (Csaba et al., 1998; Frungieri et al., 1999). La concentración baja de 5-HT hipotalámica afecta el desarrollo sexual, en consecuencia, puede afectar la morfología del testículo, afectando de esta manera su funcionalidad y por consiguiente la maduración espermática epididimaria (Leung et al., 1999; Martínez Méndez, 2014; Shishkina & Dygalo, 2000), esto se corroboró con los experimentos hechos por Sethi & Chaturvedi, (2009) quienes observaron que, la administración de 5-hidroxitriptofano (5-HTP), precursor de la 5-HT, durante un periodo de 13 días, en ratones de tres semanas de edad, alteró el peso corporal, el desarrollo de las gónadas, la concentración de T, así como el número de espermatozoides. En ratas, la 5-HT estimula la secreción de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) en

las células de Leydig, a través de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, donde la CRH actúa como un regulador negativo en la generación de cAMP inducido por la gonadotropina y la producción de andrógenos (Dufau et al., 1993).

Se ha observado que, el epidídimo es un órgano que contiene altas concentraciones de 5-HT, en comparación con otros tejidos, teniendo como fuentes probables, las células epiteliales, mastocitos y células neuroendocrinas (Jimenez-Trejo et al., 2007). En la región del *caput* proximal del epidídimo, se han identificado diversos componentes que forman parte del sistema serotoninérgico por lo que esto puede ser un indicador de la síntesis local de 5-HT en este órgano (Martínez Méndez, 2014). El grupo de Leung et al. (1999) propone que, la 5-HT puede estar regulando la secreción de electrolitos y fluidos epididimarios que se encargan de mantener un ambiente óptimo para el espermatozoide, esto debido a la presencia de receptores 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>3</sub> (Jimenez-Trejo et al., 2007).

Se sabe que el sistema serotoninérgico es de los primeros sistemas en desarrollarse durante la etapa fetal (Azmitia, 2001; Verney et al., 2002). Por lo tanto, juega un papel importante en el neurodesarrollo.

### **1.5.2. 5-HT en el desarrollo**

En el cerebro de humano, las neuronas serotoninérgicas son detectadas en la quinta semana de gestación, durante los dos primeros años de nacidos hay un incremento de 5-HT a nivel sináptico y una disminución, después de los 5 años (Brummelte et al., 2017; Sodhi & Sanders-Bush, 2004). En el caso particular de la rata, se ha observado que en el estadio 10.5 días de gestación, la 5-HT se produce en la placenta antes de ser sintetizada por el cerebro del feto, por lo cual el cerebro dependerá de ella hasta que pueda comenzar a sintetizarla por su propia cuenta (Bonnin and Levitt, 2011).

Se sabe que la 5-HT se encuentra estableciendo circuitos neuronales que contribuyen al aprendizaje, el pensamiento y la respuesta al estrés, lo cual se encuentra regulado por redes de genes, factores de transcripción, receptores y enzimas metabólicas (Brummelte et al., 2017; Homberg & Contet, 2009).

Durante los primeros periodos de desarrollo, la 5-HT juega un papel importante, ya que actúa como un factor de crecimiento controlando de esta manera el desarrollo de los sistemas neuronales relacionados. Como un factor trófico, la 5-HT se encuentra regulando procesos de división celular, diferenciación, migración, mielinización, sinaptogénesis y la poda dendrítica (Brummelte et al., 2017; Gaspar et al., 2003).

Para que la 5-HT participe en estos procesos requiere la presencia de sus diferentes receptores, así como del transportador denominado SERT. La aparición de este transportador en roedores se da en el día 11 de gestación, donde la presencia del gen que codifica para SERT se identifica en las neuronas serotoninérgicas presentes en el complejo de rafe, extendiéndose por las neuronas no serotoninérgicas en los sistemas sensoriales y las regiones límbicas. La expresión de SERT en neuronas no serotoninérgicas termina durante los primeros días postnatales, que además coincide con la maduración de los circuitos neuronales (Homberg et al., 2010), por lo que la alteración o bloqueo de este transportador puede generar modificaciones en el desarrollo de los sistemas antes mencionados.

Por otro lado, la 5-HT es necesaria para que se desarrollen otros sistemas como el eje hipotálamo- hipófisis- adrenal (HHA), durante la etapa fetal y postnatal temprana (Brummelte et al., 2017). Además, se ha observado que la 5-HT se encuentra regulando la formación de neuronas GnRH-érgicas, debido a que estas neuronas presentan inervaciones y receptores para esta monoamina, y se ha demostrado que existe una correlación temporal entre la diferenciación y la migración de las neuronas de GnRH y el sistema serotoninérgico (Lauder, 2016; Li & Pelletier, 1995; Pronina et al., 2003; Whitaker-Azmitia et al., 1996).

La etapa perinatal es una etapa crítica en el desarrollo, donde la manipulación del sistema serotoninérgico puede causar alteraciones a los ejes ya mencionados, además, se ha observado que la exposición a antidepresivos en estas etapas interfiere con el desarrollo, y predispone a los infantes a desarrollar trastornos psiquiátricos (Gingrich et al., 2017). El uso de FLX durante etapas perinatales

reduce el peso corporal de la descendencia (Homberg et al., 2010), sin embargo, aún no se sabe cómo el uso de FLX afecta el desarrollo de otros sistemas, como el eje HHG.

### 1.6. Fluoxetina (FLX)

La FLX (N-methyl-3-phenyl-3-[4-(trifluoromethyl)phenoxy]propan-1-amino ) (Figura 4) es un antidepresivo que pertenece al grupo de los ISRS, es uno de los fármacos más estudiados y cuenta con estudios clínicos en más de 45 países (Ferguson & Hill, 2006), debido a su potencial terapéutico es utilizado para el tratamiento de diversos trastornos psicopatológicos entre los cuales se encuentran incluidos los trastornos del ánimo, de alimentación y obsesivo-compulsivo entre otros (Jovanović et al., 2006).

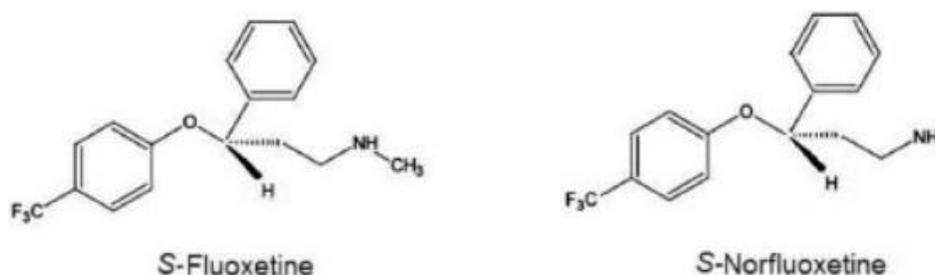


Figura 4. Estructura química de la Fluoxetina y su metabolito activo Norfluoxetina. (Imagen tomada de Bueno et al., 2011)

#### 1.6.1. Mecanismo de acción

La FLX actúan inhibiendo de forma selectiva la recaptura de serotonina en la membrana presináptica neuronal, esto mediante la unión del fármaco a SERT, provocando que la 5-HT se mantenga por más tiempo en el espacio sináptico, potenciando su efecto y evitando su degradación por la monoamino oxidasa, enzima localizada en las mitocondrias de las neurona (Altamura et al., 1994). El uso crónico de FLX sobre los receptores de 5-HT exhibe diferencias regionales, se observa que existe una disminución en los niveles de mRNA de 5-HT<sub>1A</sub> en el ráfe anterior sugiriendo una desensibilización ocasionado por el aumento de 5-HT

debido al bloqueo de SERT (Invernizzi et al., 1996; Le Poul et al., 2000). Por otro lado, el uso de FLX provoca que los receptores 5-HT<sub>2</sub> sean regulados de manera positiva en la corteza frontoparietal y el hipocampo sugiriendo un cambio neuronal adaptativo que se encuentra relacionado con el efecto antidepresivo del fármaco (Hrdina & Vu, 1993), el tratamiento crónico con FLX en la rata parece no mostrar cambios en los receptores 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>3</sub> y 5-HT<sub>4</sub> (Gobbi et al., 1997).

### **1.6.2. Farmacocinética**

La FLX es un fármaco con buena absorción tras una ingesta oral, cuenta con primer paso hepático y un alto porcentaje de unión a proteínas (aprox. de 94%), por lo que cuenta con un volumen de distribución amplio. Su vida media de eliminación en una dosis única varía de entre 1 a 4 días, mientras que su metabolito norfluoxetina (Figura 4) es de 7 a 15 días. Cabe recalcar que la FLX no tiene un perfil farmacocinético lineal, por lo que se recomienda su uso con precaución en pacientes con una capacidad hepática reducida (Altamura et al., 1994; Jovanović et al., 2006).

A diferencia de otros antidepresivos, la farmacocinética de la FLX no se ve afectada con la edad, la obesidad o la insuficiencia renal, además comparado con otros antidepresivos como los tricíclicos, presenta un mejor perfil de tolerabilidad (Altamura et al., 1994).

La FLX tiene interacción con otras drogas. Por lo tanto, la interacción de FLX con el litio, el triptófano y los IMAO son potencialmente graves y pueden conducir al "síndrome serotoninérgico", debido a los efectos farmacodinámicos sinérgicos y a la influencia de la FLX en la biodisponibilidad de estos compuestos (Altamura et al., 1994).

Es excretada mayormente por la orina siendo aproximadamente del 80%, del cual el 2.5% se excreta de forma íntegra y 10% como su metabolito activo, el resto lo hace como metabolitos conjugados (Malone & Dimeff, 1992). En mujeres puede atravesar la barrera placentaria y es excretada por la leche materna.

Se ha observado que dosis clínicas comunes (20 -40 mg) administradas a mujeres embarazadas presentan concentraciones bajas de FLX, lo que se explica por la desmetilación aumentada de la FLX por el citocromo P450, dando paso a una posible falla terapéutica (Heikkinen et al., 2003).

Los estudios hechos en mujeres embarazadas y lactantes han observado que las concentraciones de FLX y norfluoxetina al momento del nacimiento en el suero del cordón umbilical en el feto son más bajas comparadas con respecto a las madres oscilando entre 0.61 y 0.68 ng/ml para FLX y entre 0.65 y 0.71ng/ml para norfluoxetina respectivamente (Hendrick et al., 2003; Kim et al., 2006; Rampono et al., 2004). La transferencia placentaria llevada a cabo a través de la vena umbilical/vena materna de la FLX y su metabolito oscila entre el 30% y 40%, además, su presencia en el líquido amniótico se ha demostrado es menor al 10% (Carvalho et al., 2018). En la leche materna la presencia de este fármaco es relativamente pequeña, y se ha observado que se excreta entre el 3 y 6 % de FLX intacta (Hendrick et al., 2001; Kim et al., 2006).

### **1.7. Efecto de la administración de ISRS durante la etapa perinatal**

Diversos estudios reportan que el uso de ISRS en el primer trimestre del embarazo, se relaciona con malformaciones tales como microcefalias y defectos cardiacos (Louik et al., 2007), sin embargo, existen estudios de cohorte que muestran que la FLX no presenta malformaciones congénitas mayores cuando es administrada en la etapa gestacional (Yonkers et al., 2014). En algunos reportes se indica que, el uso de ISRS durante la gestación induce aumento en el riesgo de parto prematuro, dificultad para respirar durante el nacimiento, cianosis durante la lactancia, síndrome de abstinencia neonatal, que incluye irritabilidad, temblores, diarrea, disminución de la ingesta de alimento, convulsiones, problemas sensoriales, temperatura inestable, dificultad respiratoria y apnea del sueño (Homberg et al., 2010; Mouldsdale & Hermann, 2008). En cuanto a malformaciones cardiovasculares, la FLX se asocia con el riesgo de defectos septales ventriculares aislados, mientras que la paroxetina, se ha asociado con ventriculares derechos (Malm et al., 2011). Además, se han reportado efectos postnatales en niños expuestos a ISRS en el

útero, los cuales despliegan ligeros cambios en el desarrollo motor y en el control del movimiento a los 40 y 72 meses después de la exposición (Casper et al., 2003), mostrando además, déficit cognitivo. Recientemente la exposición prenatal a ISRS en el primer trimestre del embarazo, se ha asociado con un mayor riesgo de trastornos de espectro autista (Croen, 2011). También se ha asociado con alteraciones en la secreción de cortisol evaluado en saliva; sin embargo, la mayoría de los estudios que evalúan los efectos de la exposición de los ISRS han sido hasta los 8 años de edad.

Estudios en ratas expuestas a ISRS en la etapa embrionaria, han mostrado que dicho tratamiento provoca un incremento en la mortalidad neonatal y reduce el peso corporal (Homberg et al., 2010), produciendo secuelas neurológicas (Bercovici, 2005), desarrollando síntomas de desesperanza en la prueba de nado forzado (Lisboa et al., 2007), así como, un aumento de la sensibilidad a efectos gratificantes como el de la cocaína en la edad adulta (Forcelli & Heinrichs, 2008).

Es interesante señalar que, no solo existen efectos negativos ya que la exposición prenatal a ISRS también induce resultados positivos incluyendo: la disminución de la impulsividad (Lisboa et al., 2007), la mejora del aprendizaje y la memoria en la tarea del laberinto acuático de Morris, y en la de evitación pasiva (Bairy et al., 2006). También puede influenciar, de manera positiva, el desarrollo del bebe en la etapa de lactancia, ya que, se ha observado, que puede modular la organización neuroconductual, fortalecer el sistema inmune, disminuir la irritabilidad y aumentar la sociabilidad, entre otros (Field, 2008; Field et al., 2002). Sin embargo, la mayoría de las mujeres que padecen depresión después del embarazo que desean amamantar a sus hijos, optan por no llevarla a cabo, esto debido a la preocupación de los efectos colaterales que puedan llegar a tener este tipo de fármacos en el desarrollo del bebe (Field, 2008).

La FLX es un fármaco de mayor uso en el periodo postnatal y es secretada en la leche materna junto con su metabolito secundario norfluoxetina (Misri & Kostaras, 2002). Aproximadamente se tienen 57 reportes del uso de este fármaco, solo 7 presentaron cólico, llanto, convulsiones y reducción del peso corporal, aunque este

último, no fue significativo; cabe mencionar que, la mayoría de estos estudios reportan concentraciones bajas del fármaco en suero infantil, por lo que, no se han documentado otros efectos secundarios adversos (Field, 2008). En otro estudio, se midió la concentración de 5-HT en plaquetas, donde se mostraban poca o ninguna disminución en la concentración total, lo que sugiere que, el transporte de 5-HT no se ve afectado, cuando las madres están siendo tratadas con dosis entre 20 y 40 mg de FLX (Epperson et al., 2003; Field, 2008).

## **2. Antecedentes**

### **2.1. Efecto de la FLX sobre la conducta sexual masculina y parámetros testiculares**

El tratamiento con ISRS durante la gestación influye en diversos aspectos, desde lo conductual hasta nivel celular. En un modelo animal, como la rata, los estudios muestran que el tratamiento con FLX durante la gestación o la lactancia altera la conducta sexual masculina en la edad adulta a una dosis de 10 mg/ kg, reduciéndose e incluso interrumpiéndose (Santra et al., 2013), sin embargo, usando una dosis de 7.5 mg/kg no muestra alteración (Gouvêa et al., 2008).

La FLX no solo altera la conducta sexual, sino también la cito arquitectura del testículo (Ramos et al., 2016; Silva Junior et al., 2013). Al respecto, se ha observado que ratas machos expuestas en el periodo gestacional y de lactancia con una dosis de 7.5 mg/kg de FLX administrada por vía intragástrica disminuye el número de células de Sertoli a los 21 y 50 días de edad (Ramos et al., 2016). Así mismo, se observa disminución en el peso de las vesículas seminales, así como la reducción en el número de espermatozoides (Vieira et al., 2013).

Silva Junior et al.,( 2008, 2013), mostraron en ratas expuestas al tratamiento con 10 y 20 mg/kg de FLX del día 13 de gestación hasta el día 21 postnatal, que se induce una reducción de peso corporal, y del peso de los testículos a los 22 días de edad, sin alteración en el peso del epidídimo, sin embargo, a dosis de 20 mg/kg se reduce el volumen de los túbulos seminíferos, epitelio seminífero, lumen tubular, reducción en el volumen de las células de Leydig, en la longitud de los túbulos seminíferos y en las células de Sertoli, pero sin cambios en la concentración de T

(de Oliveira et al., 2013). Este efecto se mantiene cuando las ratas son adultas (90 días de edad), pero solo con la administración de 20 mg/kg, además de disminuir la producción espermática diaria por testículo, la longitud de los túbulos seminíferos además de aumentar el área individual de las células de Leydig y los niveles de T en plasma a los 90 días de edad (Monteiro Filho et al., 2014; Müller et al., 2013; de Oliveira et al., 2013).

En el caso de la administración postnatal con FLX, también se observan cambios en el testículo. Las ratas macho de la cepa Wistar inyectadas intraperitonealmente con dosis de 5, 10 y 20 mg/kg de clorhidrato de FLX del día 1 hasta los 21 días postnatales muestran un efecto similar cuando son expuestas en el útero, observándose disminución del peso de los testículos, del peso corporal, del número de células de Sertoli, disminución del volumen de células de Leydig, reducción del volumen del lumen del túbulo seminífero (10 y 20 mg/kg), disminución de espermatogonias tipo A, además de una reducción en los niveles séricos de FSH con la dosis de 5 y 10 mg/kg a los 22 días de edad, efecto que también se mantiene hasta los 150 días (Silva Junior et al., 2013).

En el caso de las ratas adultas tratadas con una dosis de 200 mg/kg por un periodo de 60 días, se induce la disminución de la espermatogénesis, así como la disminución de la densidad y movilidad espermática en la cauda del epidídimo, también se observó que provocó una disminución en la concentración de T y de FSH (Bataineh & Daradka, 2007).

A pesar de los diversos estudios donde se reportan modificaciones en la citoarquitectura del testículo, las vesículas seminales y el epidídimo, a la fecha no existen reportes que muestren si el tratamiento con FLX en etapas prenatal y de lactancia, pudiera afectar la diferenciación del epidídimo, que pudiera verse reflejado en la afectación de la funcionalidad del epidídimo, en edad adulta, afectando la maduración espermática, la calidad espermática y la fertilidad. Por lo que esta investigación pretende, evaluar el efecto de la exposición de FLX durante la gestación y el periodo de lactancia sobre la maduración y calidad espermática, así como la concentración de T en ratas adultas.

### 3. Justificación

Las mujeres embarazadas y lactantes son susceptibles a padecer trastornos de ánimo, como la depresión, por lo que muchas veces requieren de ayuda farmacológica. Entre los fármacos de primera elección se utiliza la fluoxetina (FLX), el cual es capaz de atravesar la barrera hemato-placentaria y ha sido detectado en la leche materna. Los estudios sobre aspectos reproductivos en humanos, se enfocan en adultos que presentan depresión, los cuales son tratados con 20 mg de FLX, este tratamiento les produce alteración en la concentración de T, por lo que, este fármaco afecta la concentración hormonal. Sin embargo, no hay estudios en humanos donde hayan sido expuestos a FLX durante la gestación o lactancia sobre su función reproductiva cuando llegan a la edad adulta. Estudios en animales de laboratorio como la rata Wistar, se ha observado que la administración perinatal de 20mg/kg de FLX vía intragástrica induce disminución en la concentración de espermatozoides y de T a los 90 días de edad, sin embargo, no existen datos que evalúen como afecta las funciones del epidídimo, órgano donde los espermatozoides sufren una serie de modificaciones post-testiculares que les proveen su capacidad fertilizante. Este órgano puede verse afectado por diversos factores entre los que encontramos el uso de fármacos en el embarazo, donde se ha observado que la FLX posee un posible efecto estrogénico que podría afectar la diferenciación y la maduración sexual de los individuos expuestos a ella en el útero, y durante la lactancia, esto debido que se asocia a alteraciones endocrinas que pueden estar latentes o expresarse hasta que el individuo alcance su edad reproductiva. Uno de los problemas para estudiar en humanos los efectos de la exposición de fármacos antidepresivos en útero y/o la lactancia a largo plazo, es la falta de continuidad del estudio en diferentes etapas del desarrollo del individuo. Por lo que es posible que tal exposición pueda generar anomalías conductuales y funcionales tardías. Es por esta razón que los modelos animales como la rata son de gran importancia para estudios longitudinales, lo que nos puede permitir observar el efecto de la exposición de FLX en la gestación y lactancia largo plazo.

A pesar de los diversos estudios en animales que, reportan modificaciones en la cito arquitectura del testículo, aun no se ha estudiado sí el tratamiento con FLX pudiera afectar la funcionalidad del epidídimo y la calidad espermática epididimaria, así como la fertilidad. Por lo que el interés del trabajo es analizar estos parámetros siendo indicadores de procesos reproductivos, como una aproximación al efecto en humanos expuestos durante la gestación y lactancia al tratamiento con FLX.

#### **4. Pregunta de investigación**

¿Qué efecto provoca el tratamiento con FXL durante la etapa gestacional y el periodo de lactancia sobre la maduración y calidad espermática en espermatozoides epididimarios de ratas adultas?

#### **5. Hipótesis**

El tratamiento con FLX durante la gestación y en etapa postnatal temprana disminuirá los niveles de T, y provocará modificaciones en la maduración espermática y la calidad espermática en estado adulto.

#### **6. Objetivos**

##### **6.1. Objetivo general**

Evaluar el efecto de la exposición de FLX durante la gestación y el periodo de lactancia sobre la concentración de T, así como la maduración y calidad espermática en ratas adultas.

##### **6.2. Objetivos particulares**

- Determinar el efecto de la administración de FLX durante la gestación y el periodo de lactancia sobre la concentración de T.
- Determinar el efecto de FLX sobre la calidad espermática de la progenie masculina expuesta durante la gestación y el periodo de lactancia.
- Evaluar el efecto de FLX en la distribución de carbohidratos de la membrana de espermatozoides del epidídimo, administrado durante gestación y el periodo de lactancia.

- Determinar el efecto de la administración de FLX durante la gestación y el periodo de lactancia sobre la compactación del DNA nuclear en espermatozoides.

## 7. Material y métodos

Los animales utilizados se obtuvieron del Bioterio de la UAM-Iztapalapa, los animales se mantuvieron con agua y alimento *ad libitum*, bajo un ciclo de luz controlado (12:12). Este trabajo se realizó bajo los lineamientos de la NOM-062-ZOO-1999 especificación técnica para la producción; cuidado y uso de animales de laboratorio, en conjunto con los lineamientos de la conducción ética de la investigación, la docencia y la difusión en la División de Ciencias Biológicas y de la Salud de la UAM-Iztapalapa.

Se utilizaron 10 ratas hembra de la cepa Wistar de tres meses de edad, las cuales pasaron por al menos un parto previo, los animales presentaron un peso promedio de 300g. Cada una se colocó en presencia de un macho sexualmente experto permitiéndoles la cópula hasta que los machos alcanzaron dos eyaculaciones como mínimo. A este día se le tomó como el día 0 de gestación, al quinto día se inició el tratamiento y se continuó hasta el día 21 del periodo de lactancia. Cada hembra se separó en una caja individual y fueron mantenidas en ciclos invertidos de 12: 12 horas de luz-oscuridad (luz de 20:00 a 8:00) a una temperatura constante (24 °C) y libre acceso a comida y agua.

Las hembras se dividieron en dos grupos, a cada grupo se le administró vía intragástrica los siguientes tratamientos una vez al día; grupo control (0.5 ml de solución salina); y el grupo experimental al cual se le administró una dosis de 20 mg/kg de FLX, se utilizó esta dosis debido a que se ha reportado el mayor parte de los efecto a nivel testicular (Monteiro Filho et al., 2014; Ramos et al., 2016; Silva Junior et al., 2013), por otra parte, la mayoría de las presentaciones comerciales del fármaco manejan comprimidos con dicha concentración. Las crías machos fueron separadas de sus madres 25 días después del nacimiento, y a los 4 meses

de edad fueron sometidos a los análisis calidad espermática y maduración epididimaria.

### **7.1. Concentración de Testosterona (T)**

La concentración de testosterona se obtuvo, una vez que los animales cumplieron 90 días de edad, mismos que fueron sacrificados por decapitación para la obtención de sangre, la cual se recolectó en tubos vacutainer con agentes coagulantes y gel de separación, posteriormente se procedió a centrifugarlos a 1500g durante 15 minutos. Una vez centrifugados se recuperó el suero en tubos Eppendorf de 1.5 mL y se conservaron a -20 °C hasta su uso. Se realizó la evaluación de 8 muestras para cada grupo.

La concentración de T en suero fue determinada por medio de RIA, para lo cual se usó el kit TKTT-1 Testosterone Kit, Diagnostic Product Corporation, CA, Estados Unidos. Las muestras de suero fueron descongeladas a temperatura ambiente, y agitadas en un vórtex individualmente para su homogenización. Posteriormente, en tubos plásticos con fondo recubierto de anticuerpos específicos anti- T, se depositaron 100 µL de suero problema, y se utilizó un tubo por cada muestra. Después, 200 µL de hormona (T) radiomarcada con yodo (<sup>125</sup>I) se depositaron en cada tubo, además, tubos adicionales sin recubrimiento de anticuerpo fueron utilizados para la realización de la curva de calibración y a partir del estándar incluido en el kit de trabajo se prepararon diluciones de la hormona a cuantificar; estas diluciones se designaron como cuentas totales, las cuales se evaluaron por duplicado. Posteriormente, el contenido de los tubos fue homogenizado por agitación e incubado a 37 °C durante 3 h. Transcurrido ese periodo, las muestras fueron decantadas exceptuando los tubos de las cuentas totales. Los tubos de las muestras a analizar fueron secados por inversión sobre una cama de toallas secantes durante 20 min. Después, todos los tubos se colocaron en el contador de rayos gamma (Cobra II Gamma, Modelo 5005) para medir la radiactividad de cada muestra. Los resultados de la radiactividad, expresados en cuentas por minuto (cpm) de señal radiactiva, se transformaron a concentraciones de las hormonas cuantificadas en 1 mL de muestra.

## 7.2. Obtención de los espermatozoides

Una vez recolectada la sangre se procedió a la disección del epidídimo derecho de acuerdo al procedimiento descrito en (Cervantes et al., 2008). El epidídimo se seccionó en *caput*, *corpus* y *cauda*, cada sección se depositó en una caja de cultivo de cuatro pozos debidamente etiquetado, se realizó un picado fino de cada región con tijeras de punta fina en 500 µl de solución de PBS (Buffer de fosfatos 0.001M pH 7.4) a 37° C, la suspensión celular se filtró a través de una malla de lycra con un diámetro de trama de 20 µm; y se lavaron con 500 µl de PBS, con el fin de filtrar el remanente de material biológico y así separar el fluido con espermatozoides del tejido epididimario. Posteriormente, los espermatozoides fueron lavados por centrifugación (500 g x 5 minutos), se eliminó el sobrenadante y el botón de espermatozoides se resuspendió con 1000 µl de PBS. Esta última suspensión se usó como la muestra de espermatozoides lavados.

## 7.3. Calidad espermática

La determinación espermática se realizó con la muestra de espermatozoides lavados obtenidos de cada una de las regiones del epidídimo, se determinó la calidad en términos de concentración y vitalidad, de acuerdo a los criterios establecidos por la Organización Mundial de la Salud (OMS) (WHO, 2010), modificado para rata. Se evaluaron 8 muestras del grupo control y 9 muestras del grupo tratado con FLX para cada parámetro.

**Concentración:** Con los espermatozoides lavados, se tomó una alícuota de 10 µl para realizar un conteo preliminar y proceder a la dilución adecuada, con las regiones del *caput* y *cauda* se procedió a una dilución de 1:20 (50 µl de espermatozoides lavados y 950 µl de agua destilada), para la región del *corpus* se realizó una dilución 1:5 (50 µl de espermatozoides lavados y 200 µl de agua destilada), una vez realizada la dilución se procedió al conteo en la cámara de Neubauer, 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 llevó a cabo el conteo de 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= Numero de renglones contabilizados

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

**Viabilidad:** La vitalidad 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 vital no penetrará en el espermatozoide que posee su membrana plasmática intacta (Jiménez et al., 2002). Se preparó una dilución con la muestra y el colorante a una proporción de 2:1 (5  $\mu$ L de espermatozoides lavados y 5 $\mu$  de colorante), se realizó un frotis en un portaobjetos y se dejó secar a 37 °C. Se observó al microscopio óptico con un aumento de 400x. Para cada muestra y región se contaron 200 células, posteriormente se determinó el porcentaje de espermatozoides vivos. Se consideraron como espermatozoides vivos aquellos que no presentaron tinción, y como espermatozoides muertos, los teñidos en color rojo-rosado (Figura 5).

**Morfología:** Con los mismos frotis de eosina-nigrosina se determinó el porcentaje total de espermatozoides con anomalías morfológicas (en la cabeza, pieza media y flagelo del espermatozoide), se evaluaron 200 células al microscopio óptico. A un aumento de 400x .Se realizó la evaluación espermática de acuerdo a criterios ya establecidos (Garner & Hafez, 2016), y los resultados fueron expresados en porcentaje.



*Figura 5.* Tinción de eosina- nigrosina, los espermatozoides con membrana intacta no presentan coloración (circulo) y son considerados vivos, mientras que los espermatozoides con una membrana dañada se tiñen de rosa-rojo (flechas) y son considerados muertos.

#### **7.4. Compactación del DNA con azul de anilina (AB)**

Se utilizó el colorante AB para determinar la compactación del DNA nuclear, los núcleos con mayor contenido de lisina dieron positivo a esta tinción (Figura 6), esto debido a que las histonas tienen un gran contenido de lisina, de esta manera puede inferirse que el cambio de histonas por las protaminas no fue adecuado; ya que el espermatozoide se caracteriza por tener un núcleo adecuadamente compactado (Sellami et al., 2013). Se realizaron frotis tomando una alícuota de 10µL de los espermatozoides lavados, obtenido de cada una de las regiones del epidídimo, 8 muestras del grupo control y 9 muestras del grupo tratado con FLX. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 20 minutos y se fijaron en metanol por 10 minutos. Se lavaron en agua destilada, se secaron a temperatura ambiente por 20 minutos y se realizó la tinción con AB (Azul de anilina acuosa (5% P/V) y 5 % ácido acético glacial. pH: 3.5) por 3 minutos. Posteriormente, se procedió a lavar los frotis con agua destilada teniendo cuidado de no desprender los espermatozoides. Se dejaron secar a temperatura ambiente por 20 minutos. Las laminillas fueron observadas en un microscopio óptico a un aumento de 1000x, se llevó a cabo un conteo de 200 células por cada muestra. El resultado de esta técnica permite distinguir entre espermatozoides maduros (sin teñir) e inmaduros (con tinción presente en la cabeza del espermatozoide).

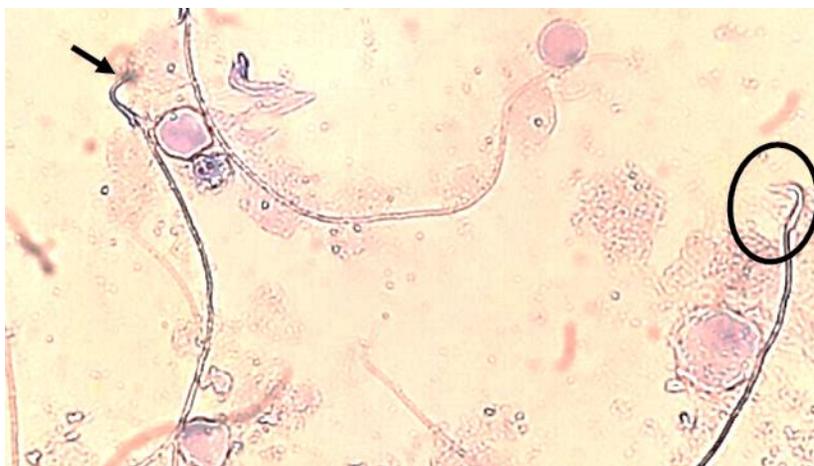


Figura 6. Tinción azul de anilina. Los espermatozoides con DNA no compactado de manera correcta toman una coloración azul (flecha), los espermatozoides con DNA compactado de manera correcta no adquieren coloración (circulo).

## 7.5. Distribución de carbohidratos

Para la determinación de glicoconjugados, se utilizaron lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína (FICT), para N-acetil glucosamina y/o ácido siálico se utilizó la lectina *Triticum vulgare* (WGA) y para manosa se utilizó *Concanavalia ensiformis aglutinina* (Con A). Se evaluaron 4 muestras del grupo control y 4 muestras del grupo tratado con FLX.

Para las regiones del *caput* y *cauda* del epidídimo se tomaron alícuotas de 200  $\mu$ l de espermatozoides lavados, para la región del *corpus* se utilizó una alícuota de 500  $\mu$ l debido a la baja concentración espermática que se encontró en esta región, todas las muestras se llevaron a 1 mL con PBS.

Las lectinas se utilizaron a una dilución de 1:50 a los espermatozoides se les adicionó una alícuota de 5  $\mu$ l y se taparon con papel aluminio, se incubaron durante 30 minutos a 37 °C. Una vez terminado el tiempo de incubación, se realizaron dos lavados por medio de una centrifugación a 500g durante 5 minutos para poder retirar los restos de lectina no unida. El botón celular se fijó en paraformaldehído (PAF 1% en PBS). Las muestras se conservaron en refrigeración hasta su evaluación, debidamente envueltas en papel aluminio.

Una vez fijada la muestra, se tomaron 10  $\mu$ l de muestra para ser observada en el microscopio de epifluorescencia de la marca Olympus BX41, los espermatozoides fueron observados a una longitud de excitación de 492 nm y un espectro de emisión de 518 nm (Jiménez et al., 2003). Los espermatozoides fueron observados en un aumento de 400x, se realizó la determinación del patrón y el porcentaje de distribución de los carbohidratos en las diferentes regiones del epidídimo, para esto se realizó un conteo de 200 células.

## **8. Análisis Estadístico.**

Los resultados obtenidos de la concentración de T, así como los parámetros de la determinación espermática y la distribución de carbohidratos y la compactación de DNA para ambos grupos (control y FLX) fueron reportados como la media  $\pm$  Error Estándar de la Media (EEM). Para todos los parámetros evaluados se realizó una t-Student y en el caso de aquellos datos reportados en porcentajes se analizaron con una prueba de Chi-cuadrada. Además, para la comparación de los patrones obtenidos entre las diferentes regiones del epidídimo se realizó un análisis de varianza de una vía (ANOVA) seguida de una prueba post-hoc de Tukey, considerando un nivel de significancia de  $p < 0.05$ . Los datos fueron analizados por el programa estadístico GraphPad Prism.

## **9. Resultados**

### **9.1. Concentración de testosterona**

La concentración sérica de T en las ratas tratadas perinatalmente con FLX no mostró diferencias significativas respecto al grupo Control ( $3.05 \pm 0.76$  y  $2.92 \pm 0.58$  ng/mL) (Figura 3).

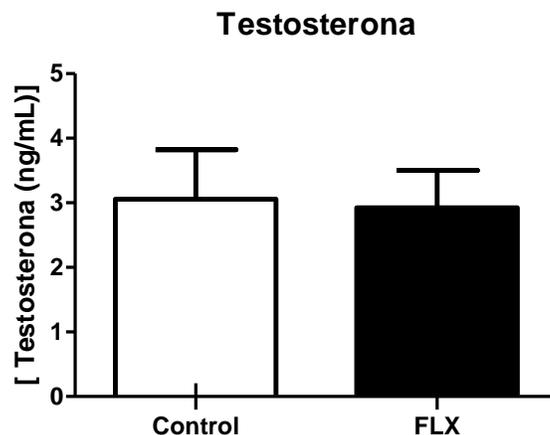


Figura 7. Efecto de la FLX sobre la concentración de T en el suero obtenido a partir de la sangre total. Cada barra representa la Media  $\pm$  E.E. No se presenta diferencias entre el grupo de FLX con respecto al grupo control. T- Student  $p < 0.05$ .

## 9.2. Parámetros de calidad espermática.

Los parámetros de calidad espermática se determinaron a partir de espermatozoides obtenidos de cada una de las regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*), el tratamiento perinatal con FLX a una concentración de 20 mg/kg no disminuye significativamente la concentración espermática ( $p=6$ ) en ninguna de las regiones con respecto al grupo control (Tabla 1).

En cuanto al porcentaje de espermatozoides vivos y muertos para cada región, se observó que la FLX no afecta el porcentaje de espermatozoides vivos (Tabla 1), debido que en ambos grupos (control y FLX), mostraron un porcentaje mayor al 90% por lo que no existe diferencia significativa ( $p=0.42$ ), en ninguna de las regiones del epidídimo.

Respecto a la evaluación de la morfología del espermatozoide se dividió en anomalías de cabeza, de flagelo, de pieza media y sin alteración morfológica (Tabla1).

Las anomalías en la región de la cabeza de los espermatozoides no mostraron diferencias significativas ( $p > 0.7$ ) al compararse el grupo tratado con FLX y el grupo

control, debido a que en ninguna de las regiones mostró valores superiores al 2% de los espermatozoides contabilizados en las tres regiones del epidídimo.

Las anomalías en la pieza media del espermatozoide (Tabla 1), para *caput corpus* o *cauda* no muestran diferencia significativa ( $p>0.3$ ), debido a que el grupo control y el grupo tratado perinatalmente con FLX presentó valores similares al control, además se observó que en la región del *caput* las anomalías de pieza media sobrepasan el 4% y disminuyen conforme pasan por el epidídimo presentando en la región de la *cauda* valores menores al 2%.

El mayor porcentaje de alteraciones morfológicas se ve observa en el flagelo (Tabla 1), se observa una disminución estadísticamente significativa en la región de la *cauda* en animales tratados con FLX ( $p>0.05$ ), presentado un porcentaje de  $10.56 \pm 1.43$  contra  $18.64 \pm 4.12$  del grupo control, el *caput* y la *cauda* no mostraron diferencias significativas ( $p>0.1$ ).

Los valores del porcentaje de espermatozoides sin alteraciones morfológicas se muestran en la tabla 1 donde no se observaron diferencias significativas ( $p>0.01$ ) para ninguna de las regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) obteniendo valores superiores a 70%.

Finalmente, el porcentaje de espermatozoides con DNA compacto evaluados con la tinción de azul de anilina, la cual permite reconocer los núcleos con un mayor contenido de lisina, indicando que el DNA no se encuentra correctamente compacto, se observó que tanto el grupo control como el grupo tratado perinatalmente con FLX mostraron porcentajes superiores al 90%, sin diferencia significativa ( $p>0.8$ ) para ninguna de las regiones (Tabla 2).

Tabla 1 Efecto de la fluoxetina (FLX) sobre los parámetros de calidad espermática en cada una de las regiones del epidídimo. Promedio Media  $\pm$  E.E. T- Student, \*  $p < 0.05$

Región del epidídimo	Caput		Corpus		Cauda	
	Control	FLX	Control	FLX	Control	FLX
Concentración	89.07 $\pm$ 14.78	79.38 $\pm$ 13.60	36.19 $\pm$ 6.66	35.98 $\pm$ 7.207	83.18 $\pm$ 9.87	92.25 $\pm$ 12.12
Espermatozoides vivos (%)	95.36 $\pm$ 0.57	94.31 $\pm$ 0.51	95.36 $\pm$ 0.67	95.94 $\pm$ 0.35	94.64 $\pm$ 0.47	95.13 $\pm$ 0.27
Anormalidades de cabeza (%)	1.286 $\pm$ 0.24	1.188 $\pm$ 0.23	1.429 $\pm$ 0.48	1.188 $\pm$ 0.26	1.143 $\pm$ 0.26	1.250 $\pm$ 0.21
Anormalidades de pieza media (%)	4.357 $\pm$ 0.26	4.438 $\pm$ 1.11	2.357 $\pm$ 0.66	2.063 $\pm$ 0.58	1.357 $\pm$ 0.26	1.000 $\pm$ 0.23
Anormalidades de flagelo (%)	19.64 $\pm$ 2.44	25.44 $\pm$ 2.62	16.71 $\pm$ 3.21	25.44 $\pm$ 2.62	18.64 $\pm$ 4.12	<b>*10.56 <math>\pm</math> 1.43</b>
Sin alteraciones morfológicas (%)	74.71 $\pm$ 2.61	68.94 $\pm$ 2.75	79.50 $\pm$ 3.58	77.69 $\pm$ 4.64	79.00 $\pm$ 4.24	87.19 $\pm$ 1.39

Tabla 2 Efecto de la fluoxetina (FLX) sobre la compactación de DNA en cada una de las regiones del epidídimo. Promedio Media  $\pm$  E.E. T- Student,\*  $p < 0.05$

Región del epidídimo	Caput		Corpus		Cauda	
	Control	FLX	Control	FLX	Control	FLX
Compactación de DNA (%)	97.29 $\pm$ 0.47	96.71 $\pm$ 0.68	97.29 $\pm$ 0.60	98.29 $\pm$ 0.47	97.00 $\pm$ 0.84	97.14 $\pm$ 0.59

### **9.3. Evaluación de la distribución de carbohidratos en la membrana del espermatozoide en las distintas regiones del epidídimo.**

#### **9.3.1. Unión de *Concanavalina ensiformis aglutinina* (Con A) a residuos de manosa**

Los resultados muestran 4 diferentes patrones de tinción con la lectina Con-A. Se realizaron esquemas de la presencia y distribución de manosa en los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, mismos que se observan en las figuras 8, 9, 10 y 11.

En la figura 8B se observa el patrón 1 (P1), la fluorescencia se observó en toda la cabeza del espermatozoide, en pieza media y pieza principal del flagelo. En la figura 8A se muestran los promedios en el porcentaje de espermatozoides que presentaron el P1 en cada región del epidídimo. Los espermatozoides del grupo control presentaron un promedio de:  $38.00 \pm 8.38$ ,  $44.60 \pm 6.78$  y  $53.50 \pm 3.81$  respectivamente para cada una de las regiones del epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*), así como los porcentajes de los espermatozoides del grupo tratado con FLX para cada región fueron de:  $28.50 \pm 6.27$ ,  $56.33 \pm 10.26$  y  $48.10 \pm 3.66$ . El análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre el grupo tratado y el grupo control, y entre cada una de las regiones. Al parecer es uno de los patrones que predominan en la membrana del espermatozoide para manosa, de los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo.

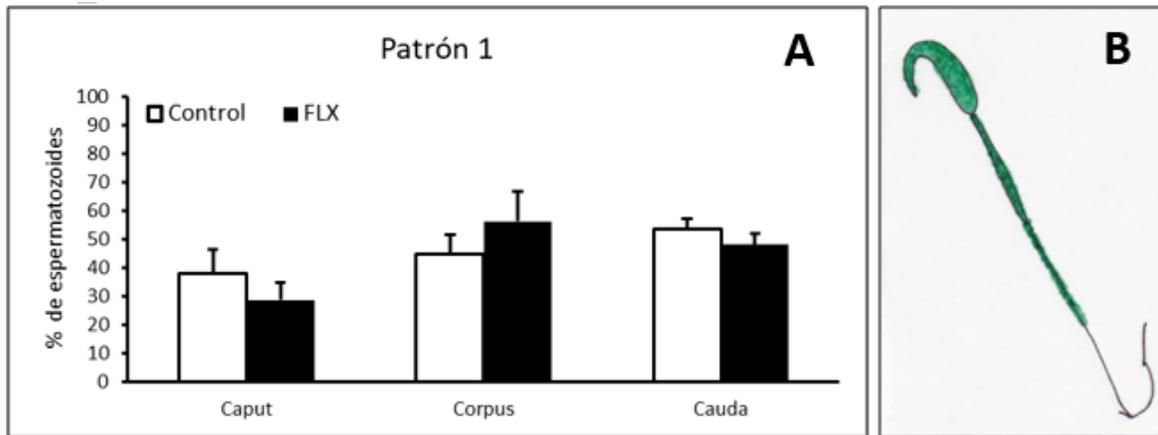


Figura 8. Efecto de la Fluoxetina (FLX) sobre la distribución de manosa en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. (A) Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón 1 (B): Fluorescencia en toda la cabeza del espermatozoide, en la pieza media y principal del flagelo. Barras representan promedio  $\pm$  E.E. Asterisco indican diferencias entre grupos (control vs FLX). T-student; letras representan diferencias entre regiones (caput, corpus y cauda) ANOVA seguida de Tukey  $p < 0.05$ .

Patrón 2 (P2) se observa en la figura 9B, la fluorescencia se encontró presente en toda la cabeza del espermatozoide y de manera aleatoria sobre la pieza media y principal del flagelo. La figura 9 muestra el promedio en los porcentajes de distribución en espermatozoides obtenidos de *caput*, *corpus* y *cauda* en el grupo control fueron de:  $11.75 \pm 6.78$ ,  $0.00 \pm 0.00$  y  $17.50 \pm 2.00$  respectivamente, donde pudimos observar que dicho patrón parece desaparecer en la región del corpus, sin embargo, vuelve a aparecer en la región de la cauda, no obstante, no existe diferencia significativa entre regiones para este grupo.

Los espermatozoides obtenidos de las ratas con el tratamiento perinatal con FLX mostraron porcentajes de:  $17.00 \pm 4.04$ ,  $34.50 \pm 15.30$  y  $0.00 \pm 0.00$  para cada región. Los resultados muestran que a medida que los espermatozoides pasan por las regiones del epidídimo el P2 se pierde como se muestra en la *cauda* del epidídimo, mostrando diferencia significativa entre grupos en esta región, además, de presentar diferencia entre regiones para este grupo.

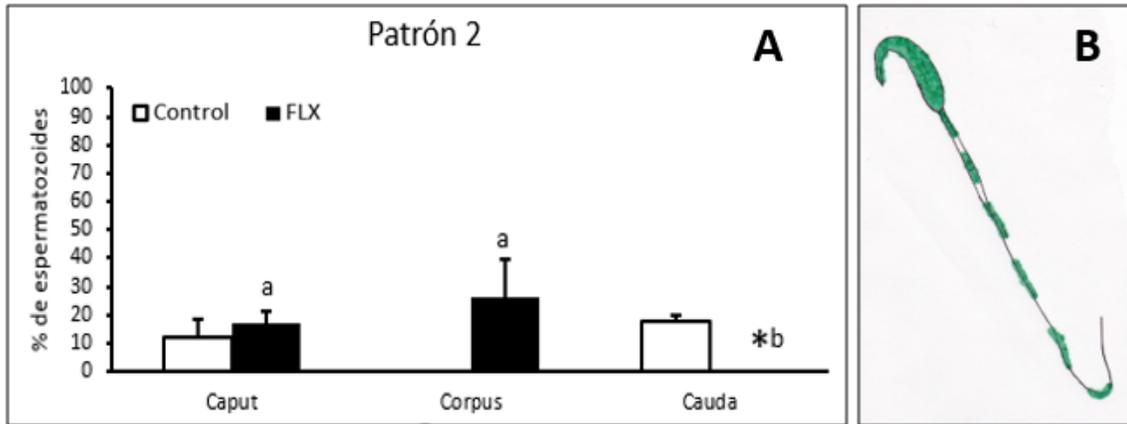


Figura 9. Efecto de la Fluoxetina (FLX) sobre la distribución de manosa en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. (A) Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón 2 (B): Fluorescencia en toda la cabeza del espermatozoide, aleatoria en la pieza media y principal del flagelo. Barras representan promedio  $\pm$  E.E. Asterisco indican diferencias entre grupos (Control vs FLX). T-student; letras representan diferencias entre regiones (*caput*, *corpus* y *cauda*) ANOVA seguida de Tukey  $p < 0.05$ .

Patrón 3 (P3) la fluorescencia se observa en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide (Figura 10B). Al igual que el P1, este patrón se observa en los espermatozoides obtenidos a lo largo de las tres regiones del epidídimo, siendo el segundo, el más abundante. Los porcentajes de espermatozoides que presentan el P3 para el grupo control en *caput*, *corpus* y *cauda* fueron de:  $45.30 \pm 7.17$ ,  $59.88 \pm 1.43$  y  $38.75 \pm 2.83$  respectivamente, al parecer se incrementa la presencia de manosa en la región del *corpus* y al llegar a la región de la *cauda* vuelve a disminuir. Sin embargo, los espermatozoides en presencia de FLX mostraron alteración en este patrón de distribución para manosa (figura 10A), se observa una disminución que a medida que los espermatozoides atraviesan el ducto epididimario disminuye su porcentaje en este patrón, presentando porcentajes de:  $41.80 \pm 10.63$ ,  $39.00 \pm 5.74$  y  $22.92 \pm 3.86$  para cada región (*caput*, *corpus* y *cauda*), mostrando diferencias significativas entre ambos grupos para la región de *corpus* y *cauda*. Pero no entre regiones.

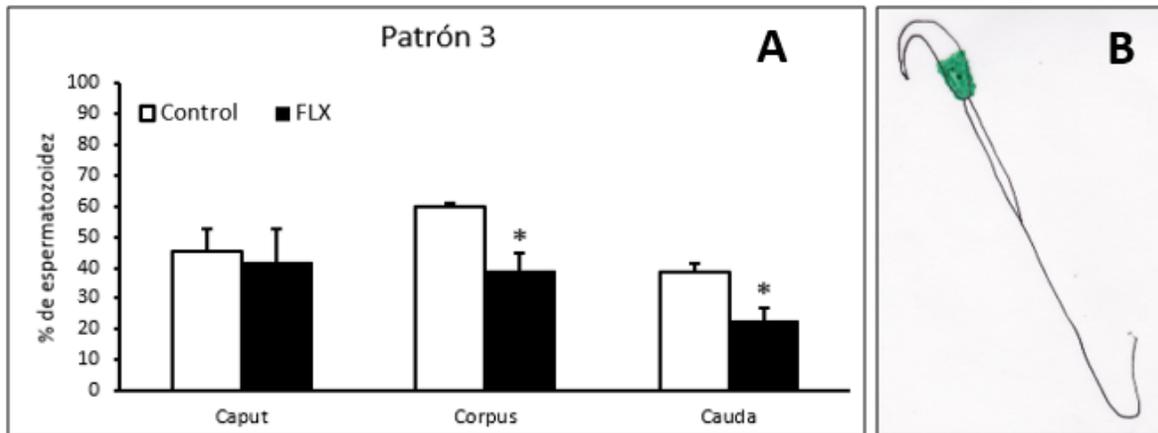


Figura 10. Efecto de la Fluoxetina (FLX) sobre la distribución de manosa en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. (A) Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón 3 (B): Fluorescencia en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide. Barras representan promedio  $\pm$  E.E. Asterisco indican diferencias entre grupos (Control vs FLX). T-student; letras representan diferencias entre regiones (*caput*, *corpus* y *cauda*) ANOVA seguida de Tukey  $p < 0.05$ .

El patrón 4, solo lo presentan los espermatozoides obtenidos de las ratas tratadas con FLX en etapas perinatales, la fluorescencia se encontró en el segmento apical y en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide, pieza media y pieza principal del flagelo (figura 11B). El porcentaje de distribución del P4 en espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones se muestra en la figura 11 A. Este se encuentra presente solo en los espermatozoides obtenidos de la región de la cauda con un porcentaje de  $31.40 \pm 8.75$  mostrando diferencia significativa contra los espermatozoides del grupo control y además entre los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones (*caput*, *corpus* y *cauda*).

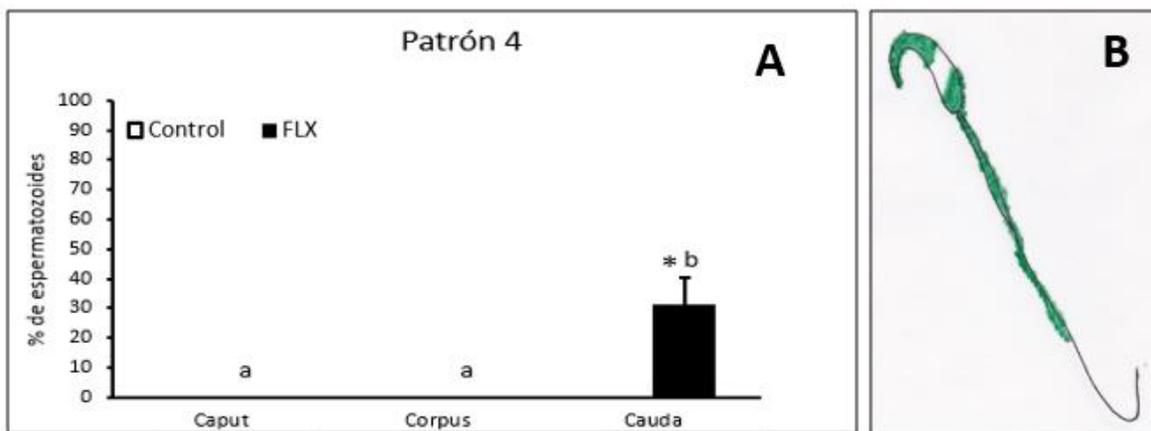


Figura 11. Efecto de la Fluoxetina (FLX) sobre la distribución de manosa en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. (A) Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón 4 (B): Fluorescencia en el segmento apical y región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide, pieza media y principal del flagelo. Barras representan promedio  $\pm$  E.E. Asterisco indican diferencias entre grupos (Control vs FLX). T-student; letras representan diferencias entre regiones (*caput*, *corpus* y *cauda*) ANOVA seguida de Tukey  $p < 0.05$ .

### 9.3.2. Unión de *Triticum vulgare aglutinina* (WGA) a residuos de N-acetilglucosamina y ácido siálico

Se realizaron esquemas de la presencia y distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico. A partir de los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, mismos que se muestran en las figuras 12, 13, 14 y 15, donde se observan 4 patrones diferentes para este azúcar, a diferencia de la manosa, la fluorescencia que se mostró en el espermatozoide fue más tenue.

Patrón 1 (P1), se observa fluorescencia en toda la cabeza del espermatozoide, pieza media y principal, (Figura 12), sin embargo, el porcentaje de distribución cambia conforme los espermatozoides avanzan del *corpus* y desaparece en la *cauda*. La FLX induce una disminución significativa en el porcentaje de espermatozoides para el P1 en la región del *caput* con respecto al grupo control, esta diferencia no se mostró para el *corpus* y la *cauda*, en esta última región el patrón desaparece para ambos grupos. Al parecer la FLX altera la distribución de N-acetilglucosamina y/o ácido siálico ya que no permite que ocurran los cambios en la región de *caput* y *corpus* como se observa en el control ( $34.17 \pm 2.77$ ,  $9.00 \pm$

4.58 y  $0.00 \pm 0.00$  mientras que para los espermatozoides del grupo tratado con FLX son de:  $20.67 \pm 3.06$ ,  $23.33 \pm 5.06$  y  $0.00 \pm 0.00$ ); el análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa entre los espermatozoides de las diferentes regiones cuando se comparó el *caput* contra el *corpus* y *cauda* en el grupo control, mientras que para el grupo tratado con FLX existe diferencia significativa cuando se comparó el *caput* y *corpus* contra la *cauda*.

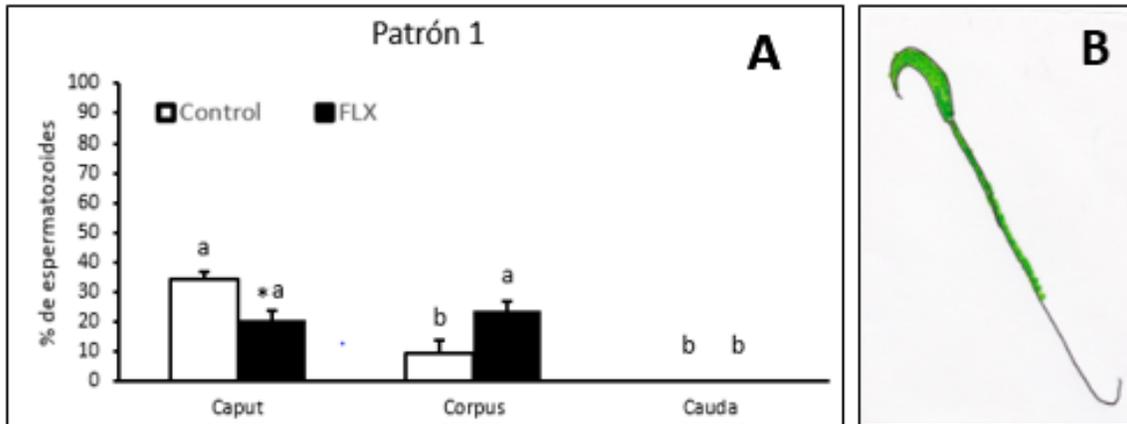


Figura 12. Efecto de la Fluoxetina (FLX) sobre la distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. (A) Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón 1 (B): Fluorescencia en toda la cabeza del espermatozoide, en la pieza media y principal del flagelo. Barras representan promedio  $\pm$  E.E. Asterisco indican diferencias entre grupos (Control vs FLX). T-student; letras representan diferencias entre regiones (*caput*, *corpus* y *cauda*) ANOVA seguida de Tukey  $p < 0.05$ .

En la figura 13B se observa un quinto patrón (P5) presente solo para estos azúcares, donde la fluorescencia se observa en todo el espermatozoide, este patrón es casi inexistente cuando el espermatozoide se encuentra en la región del *caput*, sin embargo, aparece en la región del *corpus* y se mantiene en la *cauda*.

Como se observa en la figura 13 A, el grupo control presenta porcentajes de:  $0.62 \pm 0.62$ ,  $30.17 \pm 1.69$  y  $22.50 \pm 4.43$  para *caput*, *corpus* y *cauda* respectivamente. El grupo tratado con FLX afectó lo que se describe previamente, debido a que el P5 es casi nulo en espermatozoides de la región del *corpus* marcando diferencia significativa al compararlo con el grupo control, esta diferencia desaparece en la

región de la cauda. Los porcentajes obtenidos para la FLX fueron de  $2.00 \pm 1.26$ ,  $0.37 \pm 0.37$  y  $17.80 \pm 2.30$  respectivamente para cada región.

El análisis estadístico mostró diferencia significativa entre los espermatozoides de las diferentes regiones, mientras que para el grupo tratado con FLX existe diferencia significativa cuando se compararon los espermatozoides del *caput* y *corpus* contra los de la *cauda*.

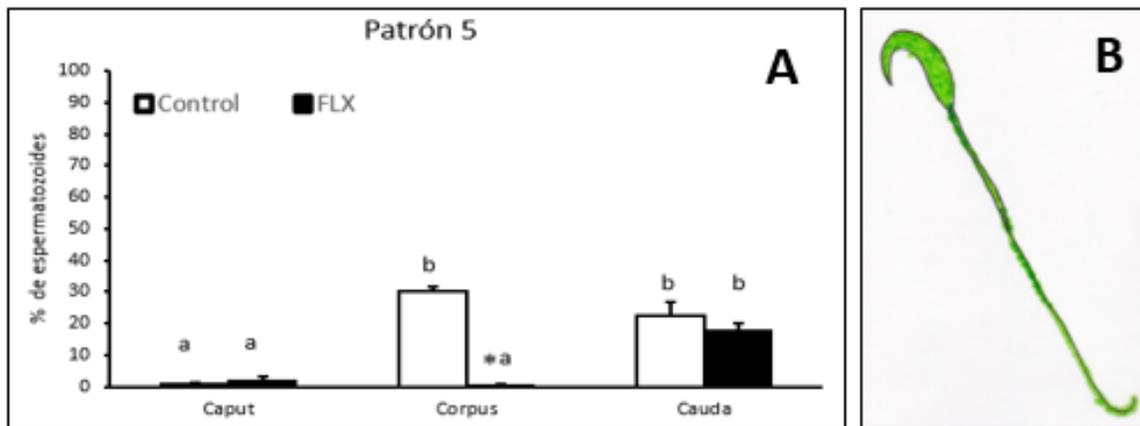


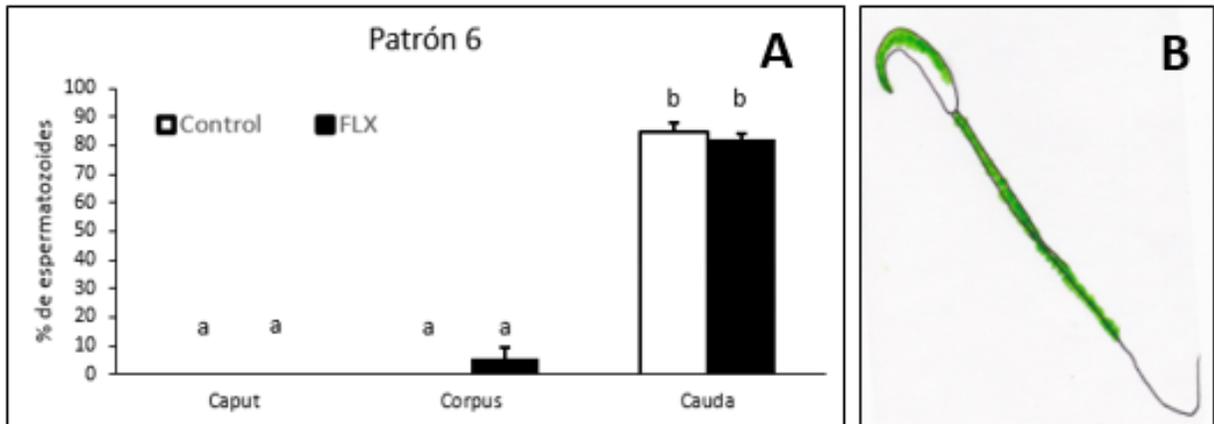
Figura 13. Efecto de la Fluoxetina (FLX) sobre la distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. (A) Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón 5 (B): Fluorescencia en todo el espermatozoide. Barras representan promedio  $\pm$  E.E. Asterisco indican diferencias entre grupos (Control vs FLX). T-student; letras representan diferencias entre regiones (*caput*, *corpus* y *cauda*) ANOVA seguida de Tukey  $p < 0.05$ .

En la figura 14B se muestra el sexto patrón (P6) donde la fluorescencia está presente en el segmento apical de la cabeza del espermatozoide, pieza media y pieza principal del flagelo.

El porcentaje de espermatozoides con este patrón se observa en la figura 14A, el grupo control solo se observa fluorescencia en la región de la cauda con un porcentaje de:  $85.00 \pm 3.23$ , muestra diferencia significativa entre regiones cuando se comparó la región del *caput* y el *corpus* contra la *cauda*.

El porcentaje de espermatozoides que presentan el P6 en el grupo tratado perinatalmente con FLX es de:  $5.833 \pm 3.68$  para el *corpus* y de  $82.20 \pm 2.10$  para

la cauda. A pesar de que este patrón aparece en una región donde el grupo control no lo presenta, no existen diferencias significativas. Por otro lado, el grupo de FLX presenta diferencia significativa al compararon espermatozoides del *caput* y *corpus* contra la región de la *cauda*.



*Figura 14.* Efecto de la Fluoxetina (FLX) sobre la distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. (A) Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón 6 (B): Fluorescencia en el segmento apical del espermatozoide, pieza media y pieza principal del flagelo. Barras representan promedio  $\pm$  E.E. Asterisco indican diferencias entre grupos (Control vs FLX). T-student; letras representan diferencias entre regiones (*caput*, *corpus* y *cauda*) ANOVA seguida de Tukey  $p < 0.05$ .

Al igual que en la manosa, los espermatozoides del grupo tratado con FLX en etapas perinatales presenta un patrón adicional (P7) para N-acetilglucosamina y ácido siálico, la fluorescencia se encontró en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide, pieza media y pieza principal del flagelo (figura 15 B). El porcentaje de espermatozoides con este patrón se observa en la figura 16 A.

El P7 se encuentra presente solo en espermatozoides obtenidos de la región del *caput* con un porcentaje de:  $57.00 \pm 13.05$  (figura 15A), mostrando diferencia significativa al compararse contra el grupo control en esta región, sin embargo, desaparece en espermatozoides de las regiones del *corpus* y la *cauda*. Adicionalmente el análisis estadístico mostró que existe diferencia significativa entre regiones al comparar el *caput* contra el *corpus* y la *cauda*.

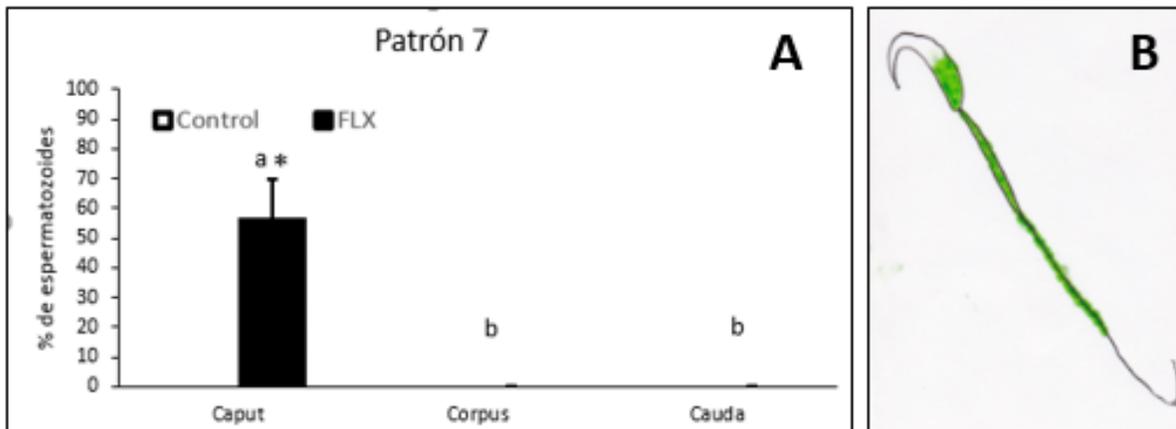


Figura 15. Efecto de la Fluoxetina (FLX) sobre la distribución de N-acetilglucosamina y ácido siálico en los espermatozoides de las diferentes regiones del epidídimo: *caput*, *corpus* y *cauda*. (A) Porcentaje de espermatozoides que presentan el patrón 6 (B): Fluorescencia en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoides, pieza media y pieza principal del flagelo. Barras representan promedio  $\pm$  E.E. Asterisco indican diferencias entre grupos (Control vs FLX). T-student; letras representan diferencias entre regiones (*caput*, *corpus* y *cauda*) ANOVA seguida de Tukey  $p < 0.05$ .

## 10. Discusión

La FLX, es uno de los ISRS más utilizado para el tratamiento de la depresión, este trastorno afecta más a las mujeres que hombres en una proporción de 2 a 1. En el caso de las mujeres embarazadas o en periodos de lactancia, son susceptibles a padecer dicho trastorno, cuyo tratamiento antidepresivo de primera de elección es la FLX. Se carecen de estudios en humanos expuestos durante la gestación y la lactancia a fármacos antidepresivos sobre aspectos reproductivos. En modelos animales, se ha reportado que la administración de FLX durante la etapa perinatal afecta procesos conductuales, hormonales y algunos aspectos reproductivos. No obstante, no hay datos del efecto de la FLX sobre la calidad y maduración espermática epididimaria durante la edad adulta. Los resultados del presente estudio, mostraron que el tratamiento perinatal con FLX no afectó la concentración de T, sin embargo, indujo anomalías en el espermatozoide, específicamente en flagelo de los espermatozoides obtenidos de la región caudal del epidídimo, sin efecto alguno en la compactación de DNA, la concentración espermática y las anomalías de cabeza y pieza media del espermatozoide; pero, al revisar los

indicadores de maduración espermática epididimaria, este tratamiento afectó los patrones de distribución en los carbohidratos de membrana en los espermatozoides obtenidos de las diferentes regiones del epidídimo, lo que nos sugiere que, el tratamiento con FLX en dosis de 20 mg/kg durante la etapa gestacional y de lactancia, no afectó la calidad espermática, pero sí la maduración de los espermatozoides evaluados mediante la distribución de carbohidratos.

La etapa perinatal de un individuo es crítica debido a que se llevan a cabo procesos de diferenciación y maduración de los órganos, entre ellos los reproductivos (Arnold, 2017), órganos que pueden verse afectados en su función por la exposición de sustancias y/o fármacos, durante etapas críticas para su diferenciación. Al respecto, estudios clínicos con la administración de ISRS y tricíclicos (FLX y CMI) durante etapas gestacionales mostraron que provocan un aumento en la concentración de 5HT induciendo síndrome serotoninérgico en los infantes quienes presentan ansiedad, frecuencia cardíaca elevada, vómito, diarrea, temblores y movimientos musculares involuntarios (Laine et al., 2003). En modelos animales, la administración crónica de diferentes ISRS como la FLX, zimeldina, LU-10-134C durante el periodo perinatal da como resultado un patrón de conductas desadaptativas como las conductas agresivas y una disminución en el comportamiento similar a la ansiedad inducidas por el tratamiento perinatal con FLX, que no son fácilmente detectadas y que además persisten durante la vida adulta (Kiryanova et al., 2016; Maciag et al., 2006), así que al alterar sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico, en este caso, con la administración de FLX a ratones hembras preñadas de la cepa CB57L produce una disminución en los niveles de 5-HT en el cerebro de la descendencia (Kiryanova et al., 2016). Por lo que, estos fármacos interfieren con la función de la 5-HT en la respuesta conductual, cuando son administrados en etapas perinatales.

Cabe resaltar que la FLX, un ISRS, al ser un compuesto lipídico atraviesa la barrera hemato-placentaria, y, además, ha sido detectado en la leche materna con una concentración más elevada que otros ISRS (Ohman et al., 1999; Spigset et al., 1997). Tanto la FLX, como su principal metabolito la Norfluoxetina muestran una

vida media alta de 1-3 días y 7-15 días, respectivamente, sugiriendo un riesgo en la acumulación tanto en la placenta como en la leche afectando principalmente a los infantes. En ratas, la administración intragástrica de 5-20 mg/ kg de FLX y norfluoxetina presentan una vida media de eliminación de 5 y 15 horas respectivamente (Caccia et al., 1990), además de acumularse por el tiempo de administración valida que la FLX administrada en las ratas se mantiene sus concentraciones induciendo su efecto durante el neurodesarrollo.

La FLX actúa inhibiendo el transportador de serotonina, neurotransmisor que tiene efecto durante el neurodesarrollo y en la edad adulta al regular el eje HHG y por ende los procesos reproductivos (Kepser & Homberg, 2015; Lyons et al., 1976; Prasad et al., 2015). Durante el neurodesarrollo la 5-HT regula la formación de las neuronas GnRH-érgicas. Se ha reportado que estas neuronas contienen inervaciones y receptores para 5-HT y se ha demostrado una correlación temporal entre la diferenciación y la migración de las neuronas de GnRH y el sistema serotoninérgico (Lauder, 2016; Li & Pelletier, 1995; Whitaker-Azmitia et al., 1996). Al respecto, el grupo de Pronina et al., (2003) evaluó la administración de p-chlorophenylalanina (pCPA), un inhibidor de la síntesis de 5-HT, durante la etapa gestacional mostrando deficiencia en la migración de las neuronas GnRH-érgicas, demostrando que la alteración en el metabolismo del sistema serotoninérgico interfiere en la diferenciación y migración de las neuronas de GnRH, validando que la 5-HT durante esta etapa actúa como un factor neurotrófico (Pronina et al., 2003), por lo que podría estar afectando la formación y maduración de diferentes procesos fisiológicos entre ellos los del eje HHG que se expresan durante la edad adulta, etapa en la que el sistema serotoninérgico regula de manera negativa la biosíntesis de GnRH (Laine et al., 2003), por lo tanto, al afectarse el sistema de GnRH por la exposición de FLX, induciendo altas concentraciones de 5-HT podría inducir una disminución en el RNAm de GnRH, acción parece estar dada por la activación de los receptores 5-HT<sub>2</sub> (Li & Pelletier, 1995). Nuestros resultados no mostraron modificaciones en las concentraciones de T, marcador final de la actividad del eje HHG, por lo que pareciera reflejar que el tratamiento con FLX a la dosis de 20mg/kg vía intragástrica no fue capaz de afectar la liberación de GnRH y

afectar la síntesis de T, sin embargo, sí se alteró la maduración espermática evaluada por la distribución de carbohidratos, reflejando que cuando inicia la maduración del epidídimo del día 10 postnatal al día 49, el tratamiento con FLX altera la función de este órgano. Un efecto similar se observó con el tratamiento neonatal con clomipramina no modificó las concentraciones de T, sin embargo altera la conducta sexual masculina (Limón-Morales et al., 2014), sugiriendo que aun cuando las concentraciones de T no se modifican, otros mecanismos parecen estar alterados al modificar la funcionalidad de otros componentes del aparato reproductor masculino durante su diferenciación por la administración de FLX en el desarrollo de los órganos sexuales como el epidídimo, órganos que muestran la presencia de 5-HT y receptores 5-HT<sub>1A</sub> junto con la enzima triptófano hidroxilasa (Jimenez-Trejo et al., 2007, 2012).

Durante el desarrollo de las gónadas, la diferenciación de las células de Leydig no requieren de la presencia de gonadotropinas como la LH, que es necesaria para la producción de T, sin embargo, sí es requerida para la maduración morfológica y funcional de las células de Leydig adultas, alrededor del día 10 postnatal (Baker & O'Shaughnessy, 2001; Baker et al., 2003; Chamindrani Mendis-Handagama & Siril Ariyaratne, 2001), el cual coincide con el periodo denominado "mini pubertad" donde el eje HHG se encuentra activo (Kuiri-Hänninen et al., 2014) por lo tanto, una alteración en la maduración morfológica y funcional de las células de Leydig podría estar afectando la cascada de señalización que induce la LH (Chimento et al., 2014). Afectando de esta manera, la concentración de T en estos periodos, ya que en estas etapas se presentan diferentes picos de T, los cuales ayudan a establecer el dimorfismo sexual en el cerebro y permite que se lleve a cabo la diferenciación de los conductos de Wolf que dan origen al epidídimo (Robaire & Hinton, 2015), sin embargo, en el presente estudio las concentraciones de T no se modificaron, considerado que este mecanismo no parece afectarse.

En nuestros resultados no se encontraron alteraciones en la concentración espermática a diferencia de lo reportado por Monteiro Filho y colaboradores (2014), en el cual, la misma dosis de 20mg/kg de clorhidrato de FLX administrada de

manera intragástrica durante la etapa perinatal provocó un aumento en el volumen de las células de Leydig y la concentración de T, pero con una disminución en la producción diaria de espermatozoides. Las diferencias de los resultados obtenidos y lo reportado, podría deberse a dos razones: primero, el periodo evaluado fue en la edad adulta, Monteiro et al, (2014), evaluó los animales en la edad de 90 días a diferencia del presente trabajo fue a los 120 días de edad. Segundo; el método de evaluación utilizado en la concentración espermática. En el presente trabajo la obtención de los espermatozoides se realizó de las diferentes regiones del epidídimo, mediante la técnica de picado y filtrado previamente descrita (Cervantes et al., 2008), una vez obtenidos los espermatozoides fueron contabilizados con la cámara Neubauer, mientras que el grupo de trabajo de Monteiro Filho y colaboradores (2014) realizó la evaluación de la concentración espermática en el testículo basados en el método de Siqueira Bringel et al., (2013), donde se hace una evaluación histomorfológica tomando en cuenta el número total de las células de Sertoli, las espermátidas redondas en la etapa VII del ciclo de epitelio seminífero y la frecuencia con la que se presenta esta etapa, lo que podría inferir en las diferencias en la concentración espermática, esto debido a que evaluaron espermátidas, espermatoцитos y espermatozoides que a diferencia de nuestros resultados, son obtenidos directamente del epidídimo, donde los espermatozoides son fagocitados cuando no maduran de manera adecuada. Además, los animales control en el trabajo de Monteiro Filho y colaboradores (2014) tuvieron una concentración de T de 1.57 ng/mL, a diferencia de nuestro grupo control que presentó una concentración de 3 ng/mL esta diferencia puede estar dada debido a las condiciones a que los animales estuvieron expuestos, además, el periodo de administración de FLX fue diferente, ya que, en el presente trabajo se inició en el quinto día de gestación a diferencia del trabajo citado donde se inició en el día 13 de gestación al considerarlo un periodo crítico en el desarrollo testicular, la diferencia temporal también pudo haber contribuido a que los parámetros antes mencionados no mostraran diferencias.

El epidídimo participa en el proceso de maduración espermática, función principal de este órgano (Gervasi & Visconti, 2017). La maduración del espermatozoide, se define

como el proceso por el cual, el espermatozoide adquiere su capacidad para moverse, para poder interactuar y fecundar al ovocito (Gervasi & Visconti, 2017; Robaire & Hinton, 2015). El proceso de maduración espermática es dependiente de andrógenos entre ellos la T. Se ha reportado que, al disminuir la concentración de T, después de una castración o hipofisectomía, los espermatozoides presentan acrosoma inmaduro, aumenta el tránsito de los espermatozoides a través del epidídimo, existe una interferencia con la adquisición en el patrón de movilidad progresiva y disminuye la capacidad fertilizante; estos efectos se revierten cuando se administra T (Dyson & Orgebin-Crist, 1973; Meistrich et al., 1975; Orgebin-Crist et al., 1975). Esto debido a que las adquisiciones de las características antes mencionadas dependen de que el epidídimo lleve a cabo sus funciones de manera adecuada, la unión de la T y la DHT al RA y su interacción con los receptores a estrógenos alfa permite que comience la transcripción y la síntesis de proteínas que favorecen los cambios que sufre el espermatozoide a través de las distintas regiones del epidídimo (Robaire and Hamzeh, 2011). A la fecha se sabe que un gran número de proteínas se secretan de forma apocrina por el epitelio epididimario, existen por lo menos 200 proteínas involucradas en la inmovilización del espermatozoide, la estabilización de la membrana y la adquisición de su poder fertilizante (Fouchécourt et al., 2000; Sutovsky et al., 2001). Si bien, la T sérica no se modifica por la administración perinatal de FLX, su conversión a DHT, y su unión con los RA podría afectarse o en su caso los receptores a estrógeno alfa. Estudios en el laboratorio muestran que el tratamiento neonatal con clomipramina afecta la expresión de los receptores a estrógenos en ovario en las ratas hembras (Pérez-Bautista, 2018), que parece sugerir que la FLX podría alterar la función o expresión de los receptores a estrógenos alfa, esta hipótesis se sustenta sobre resultados que indican que la ISRS interactúan con los receptores a estrógenos (Pop et al., 2015), estableciendo que puede afectar los mecanismos endocrinos, esto a través de estudios in vitro e in vivo (en diferentes tipos peces y roedores) muestran que la FLX puede reducir la expresión de los receptores a estrógenos en el hipotálamo y que puede actuar como un agonista del receptor (Müller et al., 2012) . Además, la FLX interfiere con la

regulación neuroendocrina de la esteroidogénesis y gametogénesis (Mennigen et al., 2010).

Por otro lado se ha propuesto que la T también es indispensable para el mantenimiento del epitelio epididimario, ya que el buen funcionamiento celular no solo brinda los elementos necesarios para la maduración, sino que también protege al espermatozoide del estrés oxidante ocasionado por los ambientes cambiantes dentro del túbulo epididimario y el almacenamiento prolongado de los espermatozoides en la cauda del epidídimo, una de las funciones del epidídimo es la eliminación de espermatozoides defectuosos, por lo que, los espermatozoides que presentan alguna deficiencia o alteración morfológica son degradados (Ramos-Ibeas et al., 2013; Robaire & Hinton, 2015), provocando que la cantidad de espermatozoides defectuosos disminuya de *caput a cauda*.

Los espermatozoides que presentan con algún tipo de anomalía son identificados gracias a la presencia de ubiquitina adherida a la membrana plasmática del espermatozoide, para que posteriormente pueda ser degradado y fagocitado por el epidídimo, permitiendo de esta manera dejar a los espermatozoides que se encuentran en buen estado y puedan llevar a cabo la fertilización del ovocito (Sutovsky et al., 2001). Contradictoriamente, los resultados de vitalidad y morfología no reflejan dicha actividad ya que no se encontraron diferencias significativas en ninguno de los parámetros mencionados para las tres regiones del epidídimo tanto para el grupo control como para el grupo de 20mg/Kg de FLX, aunado a esto observamos que las anomalías de cabeza y pieza media en los espermatozoides de los animales tratados con FLX parecen no disminuir conforme son transportados del *caput* a la *cauda*, además de no presentar diferencia significativa con respecto al grupo control, por otra parte, las anomalías en el flagelo espermático del grupo tratado con FLX parecen disminuir en la región caudal, esto probablemente se deba a que el tratamiento perinatal con FLX a pesar de no estar afectando la concentración de T en la edad adulta podría estar afectando dicha concentración durante la gestación y lactancia, interviniendo de esta manera en la diferenciación del epidídimo provocando que las células que lo conforman se alteren y no lleven de

manera adecuada su función. Además, lado esta disfunción también puede deberse a una atrofia en los RA.

Cabe resaltar que esto todavía tiene que ser demostrado por lo cual se sugieren más estudios al respecto, debido a que el epidídimo, surge embriológicamente desde la región nefrótica del feto, además las células mesonéfricas comienzan a migrar para formar una red difusa de conductos, en presencia de AMH, la porción craneal del conducto de Wolf forma el epidídimo. Estas células se desarrollan y proliferan bajo la influencia de la T, y se forman en un solo túbulo por la gestación tardía (Marty et al., 2003). Sun & Flickinger, (1979) nombran tres períodos de ontogenia del epidídimo de rata: un período indiferenciado (nacimiento al DPN 15), un período de diferenciación (DPN16-44) y un período de expansión (DPN 44) (Robaire & Hinton, 2015). Cabe mencionar que el periodo de mayor división y diferenciación celular en el epidídimo, se encuentra entre el día postnatal 25 y 30 , donde la T testicular es importante para que este proceso se lleve a cabo, aunado a esto la barrera hemato-epididimaria se completa en el día 21 postnatal (Marty et al., 2003) , por lo que el uso de fármacos que puedan estar afectando al eje HHT, en etapa postnatal, como en el presente estudio, puede afectar su diferenciación y por ende, pueda estar afectando la funcionalidad de las células que forman parte del tejido epitelial de epidídimo, así como los RA y los ERA, los cuales participan de manera activa en la secreción de las enzimas y iones que permiten se lleve a cabo procesos como la hipercompactación del núcleo y el reacomodo de los carbohidratos presentes en la membrana plasmática del espermatozoide (Tulsiani et al., 1993).

Las células principales podrían ser las que mayormente se pudieron ver afectadas con el tratamiento de FLX, esto debido a que como su nombre lo dice son las células que se encuentran en mayor abundancia y que se distribuyen a lo largo de las tres regiones del epidídimo y que se caracterizan por su alta capacidad de absorción y secreción (Dacheux et al., 2005), por lo que se encuentran altamente involucradas en los cambios post-traduccionales que se llevan a cabo en el espermatozoide.

Uno de estos cambios, que ocurren en el espermatozoide a medida que avanza por el tubo epididimario es la hiper-compactación de DNA que permite la estabilización

de los núcleos espermáticos mediante la formación de puentes disulfuro entre protaminas (Axnér, 2006; Gervasi & Visconti, 2017). Se ha observado que el porcentaje de espermatozoides con condensación incompleta de cromatina se correlaciona con el porcentaje de cabezas morfológicamente anormales (Axnér, 2006), además se ha propuesto que este proceso también requiere de la presencia de andrógenos para poder llevarse a cabo (Chapman & Michael, 2003), por lo que el tratamiento perinatal con FLX no parece afectar este proceso, ya que tanto el grupo control y el grupo tratado con 20 mg/ Kg de FLX muestran una concordancia con lo mencionado anteriormente, al presentarse un bajo porcentaje (menor al 2%) en las anomalías de la cabeza del espermatozoide y un alto porcentaje (mayor al 90%) de espermatozoides con DNA compacto, esto sucedió para las tres regiones del epidídimo, con la tinción realizada no podemos observar la fragmentación de DNA por lo que sugerimos realizar otra prueba que nos permita observar si el uso de FLX durante la etapa perinatal podría llegar a afectar la integridad del material genético, ya que se sabe que la fragmentación o el daño del DNA es una causa frecuente de infertilidad masculina (Zeqiraj et al., 2018).

Otro cambio que sufre el espermatozoide en su membrana es la adición, eliminación y modificación de azúcares, los cuales forman parte de una matriz extracelular denominada glicocalix. Después de completar la espermatogénesis, los espermatozoides salen de los testículos y entran en el lumen del epidídimo. En este punto, los espermatozoides son incapaces de producir sus propios glicoconjugados debido a la ausencia de un AG. Sin embargo, los glicanos en la superficie del espermatozoide se puede modificar al pasar los espermatozoides a través del epidídimo que actúa como “un Golgi” (Teclé & Gagneux, 2015).

Al parecer la regulación espacial de la glicosilación sucede a lo largo del epidídimo, basado en diferentes tinciones con lectina, se ha propuesto un perfil de glicoconjugados en los diferentes tipos celulares o estructuras de este órgano. Por ejemplo, en las tres regiones epidídimo (*caput*, *corpus* y *cauda*) del ratón, se observó tinción con las lectinas PNA (*Arachis hypogae*), DBA (*Dolichos Biflorus aglutinina*) y SNA (*Sambucus Nigra aglutinina*), que reflejan la presencia de residuos de 1,3-

galactosa, acetilgalactosamina, y ácido siálico unidos, respectivamente a las microvellosidades de las células principales. Al contrario, la lectina VAA (*Viscum album aglutinina*) que es específica para D-galactosa, se observó en las microvellosidades de *caput* proximal, *corpus*, y *cauda*, pero está ausente en *caput* distal. MAA1 (*Maackia amurens aglutinina*) la tinción se observa sólo en microvilli de *caput* proximal, mientras que JAC (Jacalin, de *Artocarpus integrifolia*) la tinción se produce en todas las secciones del *caput* (Lohr et al., 2010).

En el presente trabajo se mostró la presencia de residuos de manosa, N-acetilglucosamina y/o ácido siálico en la membrana de espermatozoides epididimarios. Mediante el uso de lectinas que se unen específicamente a determinados azúcares, se observaron cambios en su distribución conforme pasa el espermatozoide a través del epidídimo, estos resultados coinciden con lo reportado en otras especies. En ovino demostraron la presencia de galactosa en la membrana de la cabeza del espermatozoide y disminuye de la célula de manera progresiva conforme pasa a lo largo del epidídimo. Así mismo se mostró la presencia de ácido siálico y N-acetilgalactosamina en la región del *caput*, incrementándose en la *cauda* del epidídimo. Otros residuos de carbohidratos como la D- glucosa y D- manosa se presentan con mayor proporción en las membranas de los espermatozoides de la *cauda* y *caput*, pero, en menor cantidad en las células del *corpus* epididimario (Hammerstedt et al., 1982; Tulsiani et al., 1998).

Manosa es un carbohidrato que se ha estudiado ampliamente en el proceso de capacitación y fertilización, debido a que forma parte de la membrana plasmática de los espermatozoides, y se ha observado que los residuos de manosa se relacionan con el sitio de reconocimiento entre el espermatozoide y la zona pelúcida del ovocito (Mori et al., 1989; Rosano et al., 2007; Tanghe et al., 2004), además se ha propuesto que su presencia en la membrana plasmática del espermatozoide le confiere flexibilidad, característica que es importante para que se lleve a cabo la movilidad (Aliabadi et al., 2013; Hernández-Rodríguez, 2016).

En el presente trabajo se observaron 4 patrones distintos para manosa, el P1 mostró fluorescencia en la cabeza del espermatozoide, en la pieza media y principal del

flagelo, en el P2 en toda la cabeza del espermatozoide y de manera aleatoria sobre la pieza media y principal del flagelo, el P3 mostró fluorescencia en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide y finalmente el P4 la fluorescencia se observó en el segmento apical y en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoide. Los resultados mostraron que los patrones 1 y 3 fueron los de mayor frecuencia, el P1 mostró incremento en los residuos de manosa en la membrana, conforme pasan los espermatozoides a través del epidídimo, presentando mayor porcentaje en la *cauda*. A diferencia, el P3 presentó mayor porcentaje en la región del *corpus*. En ambos casos el marcaje predominante fue en la región de la cabeza espermática. Por otro lado, los resultados en presencia de FLX muestran modificaciones en la distribución de residuos de manosa principalmente en los P2 y P3. En el P2 se observa un mayor marcaje con Con A en la región del *corpus* a diferencia del control que no presentó marcaje y contrariamente al control, P2 desaparece en la región caudal del epidídimo. El P4 solo aparece en la región de la *cauda* mientras que el grupo control no lo presenta en ninguna de las regiones epididimarias. El P3, el porcentaje de espermatozoides con este patrón se encuentra en menor proporción con respecto al grupo control mostrando diferencia en la región del *corpus* y de la *cauda*. Nuestros resultados indican que FLX altera la maduración epididimaria modificando la distribución de manosa, esto provoca daños en la superficie espermática ya que durante la maduración se requiere de cambios importantes que ocurren por la adición de nuevas moléculas de origen epididimario o por el enmascaramiento o la modificación de algunos de los componentes de superficie preexistentes.

Se ha reportado que la unión de Con A a la manosa parece no verse afectada conforme atraviesa el tubo epididimario, sin embargo, el patrón de fluorescencia observado para diversas especies se refleja en la cabeza del espermatozoide, específicamente en la región acrosomal (Lewin et al., 1979; Nicolson et al., 1977; Sarkar et al., 1991). La lectina Con A se utiliza para determinar la integridad del acrosoma. En espermatozoides de diversos mamíferos, se han realizado estudios ultraestructurales en donde se observa que manosa se une preferencialmente a la membrana interna del acrosoma (Runnebaum et al., 1995; Tao et al., 1993). En

humano se ha observado que Con A se une a la región anterior de la cabeza del espermatozoide capacitado; al inducir la RA, se observó que la lectina se une a la región ecuatorial y a la membrana acrosomal interna (Fierro et al., 1996; Vazquez et al., 1996). En cerdo se observó que, en espermatozoides sin capacitar, la lectina se encuentra en la cabeza y en la pieza media, aunque en baja cantidad; después de la capacitación, los residuos de manosa se incrementan significativamente en la región acrosomal, por lo que concluyen que la expresión de los residuos de manosa se relacionan con el estado acrosomal del espermatozoide y su potencial fertilizante (Jiménez et al., 2003).

Por otro lado, consideramos que estas modificaciones en los patrones pueden ser causadas por la alteración de la enzima manosiltransferasa, la cual su funcionamiento depende de la presencia androgénica (Lusem et al., 1984), sin embargo, su funcionamiento también puede verse alterado por una mutación que puede ser ocasionada por una falla en el funcionamiento de las células principales, sin embargo, esto solo es una hipótesis que debe ser estudiada más a fondo así mismo, falta por dilucidar si la modificación observada influye directamente en el potencial fertilizante de los espermatozoides tratados con FLX.

Los carbohidratos N-acetilglucosamina y ácido siálico fueron evaluados con el uso de la lectina WGA. Estos carbohidratos participan en el reconocimiento de los gametos (Miller et al., 1993) y es requerido para llevar a cabo la reacción acrosomal y la fertilización (Tulsiani & Abou-Haila, 2012), el ácido siálico es otro carbohidrato que se encuentra relacionado en los procesos antes mencionados (Cortés et al., 2004), además de que su presencia incrementa la carga negativa de la membrana del espermatozoide durante su tránsito en las diferentes regiones del epidídimo, evitando de esta manera la adhesión de los espermatozoides (Hernández-Rodríguez, 2016).

Al igual que en la manosa, se detectaron 4 patrones para estos carbohidratos: el P1 observado en los residuos de manosa se repite para estos carbohidratos, en presencia de FLX provoca cambio en la distribución de los carbohidratos, no permite cambios manteniendo el marcaje en la región del *caput* y *corpus*, diferente al control que muestra disminución en el *corpus*, estos resultados coinciden con lo ya

reportado, donde se observa mayor marcaje en la región del *caput* durante la maduración espermática (Lohr et al., 2010). El P5 presentó fluorescencia en todo el espermatozoide, así mismo observamos que la FLX provoca alteraciones en el marcaje de la lectina WGA, ya que se observa una disminución considerable en las regiones del *corpus* y la *cauda* comparado con el grupo control. en el P6 se observó fluorescencia en el segmento apical del espermatozoide, pieza media y pieza principal del flagelo, finalmente el P7 presentó fluorescencia en la región postacrosomal de la cabeza del espermatozoides, pieza media y pieza principal del flagelo. Cabe resaltar que la intensidad de la fluorescencia fue menor en comparación al presentado por la lectina Con A.

Se ha reportado que la unión de WGA a estos carbohidratos se ve reflejado a nivel del acrosoma (Nicolson et al., 1977), por lo que coincide con el marcaje del P6 y corresponde al patrón más abundante en la *cauda* del epidídimo, donde además no se encuentra diferencia significativa con el grupo tratado con FLX con respecto al grupo control, y concuerda con la actividad reflejada en las enzimas glicosiltransferasas que regulan este proceso (Nacetilglucosamiltransferasa y sialiltransferasa), donde se ha observado que, la región del *caput* a la *cauda*, la actividad de estas enzimas va en aumento, específicamente en la región del *corpus* (Tulsiani, 2006), lo que puede verse reflejado en el P5 presentado en la figura 13, donde además observamos que este patrón se encuentra disminuido en el *corpus* para el grupo tratado con FLX, de la misma forma que en el P1 para la región del *caput*.

Al igual que en la manosa, existe un patrón extra para estos carbohidratos que solo se encuentra presente en el grupo tratado con FLX, el cual se presentó en la región del *caput*. Esto puede estar indicando que pudo haber una modificación en la distribución de estos carbohidratos durante la espermatogénesis y que además las funcionalidades de las enzimas correspondientes pueden estar involucradas en el reflejo de estas modificaciones, sin embargo, aún hace falta realizar más estudios para saber si dichas modificaciones se encuentran involucradas en la correcta

maduración del espermatozoide que le impidan realizar el proceso de capacitación y fertilización.

### **11. Conclusión**

La FLX administrada a una dosis de 20mg/kg durante la gestación y la lactancia no afecta la concentración de T y en consecuencia no afecta los parámetros de calidad espermática aquí presentados, sin embargo, si afecta la distribución de carbohidratos de membrana lo cual nos sugiere que el tratamiento puede estar interfiriendo en la maduración del espermatozoide debido a alguna alteración en las etapas tempranas de la diferenciación del epidídimo, pero esto aún debe ser investigado.

### **12. Perspectivas**

Las posibilidades para la continuación de este proyecto son muchas, empezando por la comprobación del efecto sobre la concentración de T en etapa perinatal y puberal por efecto de la FLX, así como la comprobación de la existencia de receptores de 5-HT y de SERT y la posible función de 5-HT durante la diferenciación testicular y epididimaria, esto debido a que el conocimiento que se tiene sobre la función de 5-HT en etapa perinatal se ha centrado en el SNC dejando de lado su posible participación en la periferia. Por otro lado, se debe verificar si la modificación de los carbohidratos en la membrana plasmática de los espermatozoides, son un impedimento para poder llevar a cabo la capacitación, reacción acrosomal y la fertilidad.

### **13. Referencias**

Adamali, H.I., & Hermo, L. (1996). Apical and narrow cells are distinct cell types differing in their structure, distribution, and functions in the adult rat epididymis. *J. Androl.* 17, 208–222.

Agarwal, A., Majzoub, A., Esteves, S.C., Ko, E., Ramasamy, R., & Zini, A. (2016). Clinical utility of sperm DNA fragmentation testing: practice recommendations based on clinical scenarios. *Transl. Androl. Urol.* 5, 935–950.

Akabarsha, M.A., Faisal, K., & Radha, A. (2015). The epididymis: Structure and Function. In *Mammalian Endocrinology and Male Reproductive Biology*, (CRC Press/Taylor & Francis), pp. 115–165.

Aliabadi, E., Karimi, F., & Talaei-Khozani, T. (2013). Effects of L-carnitine and pentoxifylline on carbohydrate distribution of mouse testicular sperm membrane. *Iran. J. Med. Sci.* 38, 107–115.

Altamura, A.C., Moro, A.R., & Percudani, M. (1994). Clinical Pharmacokinetics of Fluoxetine: *Clin. Pharmacokinet.* 26, 201–214.

Álvarez-González, E. (1989). *Andrología: teoría y práctica* (Madrid: Ediciones Díaz de Santos).

Andrabi, S.M.H. (2007). Mammalian sperm chromatin structure and assessment of DNA fragmentation. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 561–569.

Arnold, A.P. (2017). A general theory of sexual differentiation: A General Theory of Sexual Differentiation. *J. Neurosci. Res.* 95, 291–300.

Awano, M., Kawaguchi, A., & Mohri, H. (1993). Lipid composition of hamster epididymal spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 99, 375–383.

Axnér, E. (2006). Sperm maturation in the domestic cat. *Theriogenology* 66, 14–24.

Azmitia, E.C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* 56, 413–424.

Bairy, K.L., Madhyastha, S., Ashok, K.P., Bairy, I., & Malini, S. (2006). Developmental and Behavioral Consequences of Prenatal Fluoxetine. *Pharmacology* 79, 1–11.

Baker, P., & O'Shaughnessy, P. (2001). Role of gonadotrophins in regulating numbers of Leydig and Sertoli cells during fetal and postnatal development in mice. *Reproduction* 122, 227–234.

Baker, P.J., Johnston, H., Abel, M., Charlton, H.M., & O'Shaughnessy, P.J. (2003). Differentiation of adult-type Leydig cells occurs in gonadotrophin-deficient mice. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 1, 4.

Balhorn, R. (2007). The protamine family of sperm nuclear proteins. *Genome Biol.* 8, 227.

Barrio, R., Roldán, B., & Martín- Frias, M. (2015). Inducción de la pubertad. *Rev. Esp. Endocrinol. Pediátrica*.

Bataineh, H.N., and Daradka, T. (2007). Effects of long-term use of fluoxetine on fertility parameters in adult male rats. *Neuro Endocrinol. Lett.* 28, 321–325.

Bear, M.F., Connors, B.W., & Paradiso, M.A. (2016). *Neurociencia: la exploración del cerebro*, 4ª edición (L'Hospitalet de Llobregat: Wolters Kluwer).

Beck-Peccoz, P., Padmanabhan, V., Baggiani, A.M., Cortelazzi, D., Buscaglia, M., Medri, G., Marconi, A.M., Pardi, G., & Beitins, I.Z. (1991). Maturation of Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Function in Normal Human Fetuses: Circulating Levels of Gonadotropins, Their Common  $\alpha$ -Subunit and Free Testosterone, and Discrepancy between Immunological and Biological Activities of Circulating Follicle-Stimulating Hormone\*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 73, 525–532.

Bedford, Jm. (2015). The epididymis re-visited: a personal view. *Asian J. Androl.* 0, 0.

Belleannee, C., Belghazi, M., Labas, V., Teixeira-Gomes, A.-P., Gatti, J.L., Dacheux, J.-L., & Dacheux, F. (2011). Purification and identification of sperm surface proteins and changes during epididymal maturation. *PROTEOMICS* 11, 1952–1964.

Benoit, J. (1926). Recherches anatomiques, cytologiques et histophysiologiques, sur les voies excrétrices du testicules chez les mammiferes. *Arch. Anat. Histol. Embryol. Norm. Expérimentales* 5, 173–412.

Bercovici, E. (2005). Prenatal and perinatal effects of psychotropic drugs on neuro-cognitive development in the fetus. *J. Dev. Disabil.* 11, 1–20.

Björkgren, I., Gylling, H., Turunen, H., Huhtaniemi, I., Strauss, L., Poutanen, M., & Sipilä, P. (2015). Imbalanced lipid homeostasis in the conditional *Dicer1* knockout mouse epididymis causes instability of the sperm membrane. *FASEB J.* 29, 433–442.

Bonilla-Jaime, H., Retana-Marquez, S., Vazquez-Palacios, G., & Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Corticosterone and Testosterone Levels after Chronic Stress in an Animal Model of Depression. *Neuropsychobiology* 48, 55–58.

Bonnin, A., & Levitt, P. (2011). Fetal, maternal, and placental sources of serotonin and new implications for developmental programming of the brain. *Neuroscience* 197, 1–7.

Brummelte, S., Mc Glanaghy, E., Bonnin, A., & Oberlander, T.F. (2017). Developmental changes in serotonin signaling: Implications for early brain function, behavior and adaptation. *Neuroscience* 342, 212–231.

Bueno, J.S., Silva, B.J., & Queiroz, M.E.C. (2011). Enantioselective analysis of fluoxetine and norfluoxetine in plasma samples by protein precipitation and liquid chromatography with fluorescence detection. *J. Braz. Chem. Soc.* 22, 1221–1228.

Butenandt, A. (1931). Über die chemische Untersuchung der Sexualhormone. *Z. Für Angew. Chem.* 44, 905–908.

- Caccia, S., Cappi, M., Fracasso, C., & Garattini, S. (1990). Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat. *Psychopharmacology (Berl.)* 100, 509–514.
- Carvalho, D.M., Lanchote, V.L., de Oliveira Filgueira, G.C., Nardotto, G.H.B., Duarte, G., Cavalli, R.C., & Moisés, E.C.D. (2018). Pharmacokinetics and transplacental transfer of fluoxetine enantiomers and their metabolites in pregnant women. *Clin. Pharmacol. Ther.*
- Casper, R.C., Fleisher, B.E., Lee-Ancajas, J.C., Gilles, A., Gaylor, E., DeBattista, A., & Hoyme, H.E. (2003). Follow-up of children of depressed mothers exposed or not exposed to antidepressant drugs during pregnancy. *J. Pediatr.* 142, 402–408.
- Cervantes, M.I., Arenas-Ríos, E., Miguel Ángel, L.-G., Ricardo, L.-W., Demetrio, A., & Adolfo, R. (2008). Spermatozoa Epididymal Maturation in the Mexican Big-Eared Bat (*Corynorhinus Mexicanus*). *Syst. Biol. Reprod. Med.* 54, 196–204.
- Chamindrani Mendis-Handagama, S.M.L., & Siril Ariyaratne, H.B. (2001). Differentiation of the Adult Leydig Cell Population in the Postnatal Testis<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* 65, 660–671.
- Champroux, A., Torres-Carreira, J., Gharagozloo, P., Drevet, J.R., & Kocer, A. (2016). Mammalian sperm nuclear organization: resiliencies and vulnerabilities. *Basic Clin. Androl.* 26.
- Chapman, J.C., & Michael, S.D. (2003). Proposed mechanism for sperm chromatin condensation/decondensation in the male rat. *Reprod. Biol. Endocrinol. RBE* 1, 20.
- Chimento, A., Sirianni, R., Casaburi, I., & Pezzi, V. (2014). Role of Estrogen Receptors and G Protein-Coupled Estrogen Receptor in Regulation of Hypothalamus–Pituitary–Testis Axis and Spermatogenesis. *Front. Endocrinol.* 5.
- Ciranna, L. (2006). Serotonin as a modulator of glutamate- & GABA-mediated neurotransmission: implications in physiological functions and in pathology. *Curr. Neuropharmacol.* 4, 101–114.
- Cooper, G.T., & Ching-Hei, Y. (2006). Sperm maturation in the human epididymis Trevor G. Cooper and Ching-Hei Yeung. In *The Sperm Cell*, (Cambridge University Press), pp. 72–107.
- Cornwall, G.A. (2008). New insights into epididymal biology and function. *Hum. Reprod. Update* 15, 213–227.
- Cortés, P.P., Orihuela, P.A., Zúñiga, L.M., Velásquez, L.A., & Croxatto, H.B. (2004). Sperm Binding to Oviductal Epithelial Cells in the Rat: Role of Sialic Acid Residues on the Epithelial Surface and Sialic Acid-Binding Sites on the Sperm Surface<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* 71, 1262–1269.

Croen, L.A. (2011). Antidepressant Use During Pregnancy and Childhood Autism Spectrum Disorders. *Arch. Gen. Psychiatry* 68, 1104.

Cruz, P.H., Campos, E.P., Martínez, L.M., Ortiz, B., & Martínez, G. (2005). Las lectinas vegetales como modelo de estudio de las interacciones proteína-carbohidrato. *Rev. Educ. Bioquim.* 24, 21–27.

Csaba, Z., Csernus, V., & Gerendai, I. (1998). Intratesticular serotonin affects steroidogenesis in the rat testis. *J. Neuroendocrinol.* 10, 371–376.

Dacheux, J.-L., & Dacheux, F. (2013). New insights into epididymal function in relation to sperm maturation. *Reproduction* 147, R27–R42.

Dacheux, J.-L., Castella, S., Gatti, J.L., & Dacheux, F. (2005). Epididymal cell secretory activities and the role of proteins in boar sperm maturation. *Theriogenology* 63, 319–341.

Dacheux, J.-L., Belleannée, C., Jones, R., Labas, V., Belghazi, M., Guyonnet, B., Druart, X., Gatti, J.L., & Dacheux, F. (2009). Mammalian epididymal proteome. *Mol. Cell. Endocrinol.* 306, 45–50.

Davey, R.A., & Grossmann, M. (2016). Androgen Receptor Structure, Function and Biology: From Bench to Bedside. *Clin. Biochem. Rev.* 37, 3–15.

De Vries, G.J., Buijs, R.M., & Van Leeuwen, F.W. (1984). Sex Differences in Vasopressin and Other Neurotransmitter Systems in the Brain. In *Progress in Brain Research*, (Elsevier), pp. 185–203.

Drobnis, E.Z., & Nangia, A.K. (2017). Male Reproductive Functions Disrupted by Pharmacological Agents. In *Impacts of Medications on Male Fertility*, E.Z. Drobnis, and A.K. Nangia, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 13–24.

Dufau, M.L., Tinajero, J.C., & Fabbri, A. (1993). Corticotropin-releasing factor: an antireproductive hormone of the testis. *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 7, 299–307.

Dyson, A.L.M.B., & Orgebin-Crist, M.-C. (1973). Effect of Hypophysectomy, Castration and Androgen Replacement upon the Fertilizing Ability of Rat Epididymal Spermatozoa. *Endocrinology* 93, 391–402.

Epperson, C.N., Jatlow, P.I., Czarkowski, K., & Anderson, G.M. (2003). Maternal fluoxetine treatment in the postpartum period: effects on platelet serotonin and plasma drug levels in breastfeeding mother-infant pairs. *Pediatrics* 112, e425.

Fawcett, D.W., & Herranz Rodríguez, G. (1994). *Tratado de histología Bloom-Fawcett* (Madrid: McGraw-Hill/Interamericana).

Feighner, J.P. (1999). Mechanism of action of antidepressant medications. *J. Clin. Psychiatry* 60 Suppl 4, 4-11; discussion 12-13.

Feldman, R.S., Meyer, J.S., & Quenzer, L.F. (1997). Principles of neuropsychopharmacology (Sunderland, Mass: Sinauer Associates).

Ferguson, J.M., & Hill, H. (2006). Pharmacokinetics of Fluoxetine in Elderly Men and Women. *Gerontology* 52, 45–50.

Field, T. (2008). Breastfeeding and antidepressants. *Infant Behav. Dev.* 31, 481–487.

Field, T., Hernandez-Reif, M., & Feijo, L. (2002). Breastfeeding in Depressed Mother-Infant Dyads. *Early Child Dev. Care* 172, 539–545.

Fierro, R., Daniel, M., Foliguet, B., Bene, M.C., Barbarino-Monnier, P., Faure, G.C., & Gringnon, G. (1996). Acrosome reaction of human sperm: application of TEM/flow cytometry. *Aust. Coun. Deans Sci.* 12, 109–111.

Forcelli, P.A., & Heinrichs, S.C. (2008). Teratogenic effects of maternal antidepressant exposure on neural substrates of drug-seeking behavior in offspring. *Addict. Biol.* 13, 52–62.

Fouchécourt, S., Métayer, S., Locatelli, A., Dacheux, F., & Dacheux, J.L. (2000). Stallion epididymal fluid proteome: qualitative and quantitative characterization; secretion and dynamic changes of major proteins. *Biol. Reprod.* 62, 1790–1803.

Fraser, L.R., Harrison, R.A., & Herod, J.E. (1990). Characterization of a decapacitation factor associated with epididymal mouse spermatozoa. *J. Reprod. Fertil.* 89, 135–148.

French, F.S., McLean, W.S., Smith, A.A., Tindall, D.J., Weddington, S.C., Petrusz, P., Sar, M., Stumpf, W.E., Nayfeh, S.N., Hansson, V., et al. (1974). Androgen Transport and Receptor Mechanisms in Testis and Epididymis. In *Hormone Binding and Target Cell Activation in the Testis*, M.L. Dufau, and A.R. Means, eds. (Boston, MA: Springer US), pp. 265–285.

Frungieri, M., Gonzalez-Calvar, S., Rubio, M., Ozu, M., Lustig, L., & Calandra, R. (1999). Serotonin in Golden Hamster Testes: Testicular Levels, Immunolocalization and Role during Sexual Development and Photoperiodic Regression-Recrudescence Transition. *Neuroendocrinology* 69, 299–308.

Gal Iglesias, B., & Ares Luque, A. (2005). *Bases de la fisiología* (Madrid: Editorial Tébar).

Garner, D.L., & Hafez, E.S.E. (2016). Spermatozoa and Seminal Plasma. In *Reproduction in Farm Animals*, B. Hafez, and E.S. Hafez, eds. (Baltimore, Maryland, USA: Lippincott Williams & Wilkins), pp. 96–109.

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

Gervasi, M.G., & Visconti, P.E. (2017). Molecular changes and signaling events occurring in spermatozoa during epididymal maturation. *Andrology* 5, 204–218.

Gingrich, J.A., Malm, H., Ansorge, M.S., Brown, A., Sourander, A., Suri, D., Teixeira, C.M., Caffrey Cagliostro, M.K., Mahadevia, D., & Weissman, M.M. (2017). New Insights into How Serotonin Selective Reuptake Inhibitors Shape the Developing Brain: SSRI Effects on the Fetus. *Birth Defects Res.* 109, 924–932.

Glover, M.E., & Clinton, S.M. (2016). Of rodents and humans: A comparative review of the neurobehavioral effects of early life SSRI exposure in preclinical and clinical research. *Int. J. Dev. Neurosci.* 51, 50–72.

Gobbi, M., Crespi, D., Foddi, M.C., Fracasso, C., Mancini, L., Parotti, L., & Mennini, T. (1997). Effects of chronic treatment with fluoxetine and citalopram on 5-HT uptake, 5-HT<sub>1B</sub> autoreceptors, 5-HT<sub>3</sub> and 5-HT<sub>4</sub> receptors in rats. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 356, 22–28.

Godknecht, A., & Honegger, T.G. (1991). Isolation, characterization, and localization of a sperm-bound N-acetylglucosaminidase that is indispensable for fertilization in the ascidian, *Phallusia mammillata*. *Dev. Biol.* 143, 398–407.

González-Marín, C., Gosálvez, J., & Roy, R. (2012). Types, Causes, Detection and Repair of DNA Fragmentation in Animal and Human Sperm Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 13, 14026–14052.

Gouvêa, T.S., Morimoto, H.K., de Faria, M.J.S.S., Moreira, E.G., & Gerardin, D.C.C. (2008). Maternal exposure to the antidepressant fluoxetine impairs sexual motivation in adult male mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 90, 416–419.

Hafez, E.S.E., & Hafez, B. (2013). *Reproduction in Farm Animals*.

Hall, J.C., Hadley, J., & Doman, T. (1991). Correlation between changes in rat sperm membrane lipids, protein, and the membrane physical state during epididymal maturation. *J. Androl.* 12, 76–87.

Hammerstedt, R.H., Hay, S.R., & Amann, R.P. (1982). Modification of Ram Sperm Membranes During Epididymal Transit<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* 27, 745–754.

Hansson, V., Trygstad, O., French, F.S., McLean, W.S., Smith, A.A., Tindall, D.J., Weddington, S.C., Petrusz, P., Nayfeh, S.N., & Ritzén, E.M. (1974). Androgen transport and receptor mechanisms in testis and epididymis. *Nature* 250, 387–391.

Heikkinen, T., Ekblad, U., Palo, P., & Laine, K. (2003). Pharmacokinetics of fluoxetine and norfluoxetine in pregnancy and lactation. *Clin. Pharmacol. Ther.* 73, 330–337.

Hendrick, V., Stowe, Z.N., Altshuler, L.L., Mintz, J., Hwang, S., Hostetter, A., Suri, R., Leight, K., & Fukuchi, A. (2001). Fluoxetine and norfluoxetine concentrations in nursing infants and breast milk. *Biol. Psychiatry* 50, 775–782.

Hendrick, V., Stowe, Z.N., Altshuler, L.L., Hwang, S., Lee, E., & Haynes, D. (2003). Placental Passage of Antidepressant Medications. *Am. J. Psychiatry* 160, 993–996.

Herbison, A.E. (2016). Control of puberty onset and fertility by gonadotropin-releasing hormone neurons. *Nat. Rev. Endocrinol.* 12, 452–466.

Hermo, L., Dworkin, J., & Oko, R. (1988). Role of epithelial clear cells of the rat epididymis in the disposal of the contents of cytoplasmic droplets detached from spermatozoa. *Am. J. Anat.* 183, 107–124.

Hermo, L., Chong, D.L., Moffatt, P., Sly, W.S., Waheed, A., & Smith, C.E. (2005). Region- and Cell-specific Differences in the Distribution of Carbonic Anhydrases II, III, XII, and XIV in the Adult Rat Epididymis. *J. Histochem. Cytochem.* 53, 699–713.

Hernández-Rodríguez, J. (2016). Evaluación de indicadores de la maduración espermiática epididimaria de la rata wistar expuesta a cadmio. Tesis inedita de Maestría en Biología de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.

Hiort, O. (2013). The differential role of androgens in early human sex development. *BMC Med.* 11.

Holt, W.V. (1980). Surface-Bound Sialic Acid on Ram and Bull Spermatozoa: Deposition During Epididymal Transit and Stability During Washing. *Biol. Reprod.* 23, 847–857.

Homberg, J.R., & Contet, C. (2009). Deciphering the Interaction of the Corticotropin-Releasing Factor and Serotonin Brain Systems in Anxiety-Related Disorders. *J. Neurosci.* 29, 13743–13745.

Homberg, J.R., Schubert, D., & Gaspar, P. (2010). New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. *Trends Pharmacol. Sci.* 31, 60–65.

Hornung, J.-P. (2003). The human raphe nuclei and the serotonergic system. *J. Chem. Neuroanat.* 26, 331–343.

Hrdina, P.D., & Vu, T.B. (1993). Chronic fluoxetine treatment upregulates 5-HT uptake sites and 5-HT<sub>2</sub> receptors in rat brain: An autoradiographic study. *Synapse* 14, 324–331.

Invernizzi, R., Bramante, M., & Samanin, R. (1996). Role of 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the effects of acute and chronic fluoxetine on extracellular serotonin in the frontal cortex. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 54, 143–147.

Jelinsky, S.A., Turner, T.T., Bang, H.J., Finger, J.N., Solarz, M.K., Wilson, E., Brown, E.L., Kopf, G.S., & Johnston, D.S. (2007). The Rat Epididymal Transcriptome: Comparison of Segmental Gene Expression in the Rat and Mouse Epididymides1. *Biol. Reprod.* 76, 561–570.

Jiménez, I., Gonzalez-Marquez, H., Ortiz, R., Betancourt, M., Herrera, J., & Fierro, R. (2002). Expression of lectin receptors on the membrane surface of sperm of fertile and subfertile boars by flow cytometry. *Arch. Androl.* 48, 159–166.

Jiménez, I., González-Márquez, H., Ortiz, R., Herrera, J.A., García, A., Betancourt, M., & Fierro, R. (2003). Changes in the distribution of lectin receptors during capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa. *Theriogenology* 59, 1171–1180.

Jiménez García, L.F., & Merchant, H. (2003). *Biología celular y molecular* (México: Pearson Educación : Prentice Hall).

Jimenez-Trejo, F., Tapia-Rodriguez, M., Queiroz, D.B.C., Padilla, P., Avellar, M.C.W., Manzano, P.R., Manjarrez-Gutierrez, G., & Gutierrez-Ospina, 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. *J. Androl.* 28, 136–149.

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

Johnston, D.S., Jelinsky, S.A., Bang, H.J., DiCandeloro, P., Wilson, E., Kopf, G.S., & Turner, T.T. (2005). The Mouse Epididymal Transcriptome: Transcriptional Profiling of Segmental Gene Expression in the Epididymis1. *Biol. Reprod.* 73, 404–413.

Joseph, A., Shur, B.D., & Hess, R.A. (2011). Estrogen, Efferent Ductules, and the Epididymis. *Biol. Reprod.* 84, 207–217.

Jovanović, D., Kilibarda, V., Dordević, S., Jovanović, M., Jović-Stošić, J., Srdić, D., & Knežević, T. (2006). Bioequivalence testing of a new tablet formulation of generic fluoxetine. *Eur. J. Drug Metab. Pharmacokinet.* 31, 35–40.

Karl, J., & Capel, B. (1998). Sertoli Cells of the Mouse Testis Originate from the Coelomic Epithelium. *Dev. Biol.* 203, 323–333.

Kepser, L.-J., & Homberg, J.R. (2015). The neurodevelopmental effects of serotonin: A behavioural perspective. *Behav. Brain Res.* 277, 3–13.

- Kim, J., Riggs, K.W., Misri, S., Kent, N., Oberlander, T.F., Grunau, R.E., Fitzgerald, C., & Rurak, D.W. (2006). Stereoselective disposition of fluoxetine and norfluoxetine during pregnancy and breast-feeding. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 61, 155–163.
- Kiryanova, V., Meunier, S.J., Vecchiarelli, H.A., Hill, M.N., & Dyck, R.H. (2016). Effects of maternal stress and perinatal fluoxetine exposure on behavioral outcomes of adult male offspring. *Neuroscience* 320, 281–296.
- Knickmeyer, R.C., & Baron-Cohen, S. (2006). Topical Review: Fetal Testosterone and Sex Differences in Typical Social Development and in Autism. *J. Child Neurol.* 21, 825–845.
- Kuiri-Hänninen, T., Sankilampi, U., & Dunkel, L. (2014). Activation of the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis in Infancy: Minipuberty. *Horm. Res. Paediatr.* 82, 73–80.
- Kumar, G.P., Laloraya, M., Agrawal, P., & Laloraya, M.M. (2009). The involvement of surface sugars of mammalian spermatozoa in epididymal maturation and in vitro sperm-zona recognition: Die Beteiligung von Oberflächen-Zuckern von Säuger-Spermatozoen auf die Nebenhodenreifung und die in vitro Spermatozoen-Zona-Erkennung. *Andrologia* 22, 184–194.
- Kuo, Y.-W., Li, S.-H., Maeda, K.-I., Gadella, B.M., & Tsai, P.S.J. (2016). Roles of the reproductive tract in modifications of the sperm membrane surface. *J. Reprod. Dev.* 62, 337–343.
- Laine, K., Heikkinen, T., Ekblad, U., & Kero, P. (2003). Effects of Exposure to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors During Pregnancy on Serotonergic Symptoms in Newborns and Cord Blood Monoamine and Prolactin Concentrations. *Arch. Gen. Psychiatry* 60, 720.
- Lauder, J.M. (2016). Serotonin as a Differentiation Signal. *Dev. Neurosci.* 38, 239–240.
- Le Poul, E., Boni, C., Hanoun, N., Laporte, A.-M., Laaris, N., Chauveau, J., Hamon, M., & Lanfumey, L. (2000). Differential adaptation of brain 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>1B</sub> receptors and 5-HT transporter in rats treated chronically with fluoxetine. *Neuropharmacology* 39, 110–122.
- Lee, M.C., & Damjanov, I. (1984). Anatomic distribution of lectin-binding sites in mouse testis and epididymis. *Differ. Res. Biol. Divers.* 27, 74–81.
- Leung, G.P., Cheung, K., Leung, C., Tsang, M., & Wong, P.Y. (2004). Regulation of epididymal principal cell functions by basal cells: role of transient receptor potential (Trp) proteins and cyclooxygenase-1 (COX-1). *Mol. Cell. Endocrinol.* 216, 5–13.

Leung, G.P.H., Dun, S.L., Dun, N.J., & Wong, P.Y.D. (1999). Serotonin via 5-HT<sub>1B</sub> and 5-HT<sub>2B</sub> receptors stimulates anion secretion in the rat epididymal epithelium. *J. Physiol.* 519, 657–667.

Levine, N., & Kelly, H. (1978). Measurement of pH in the rat epididymis in vivo. *Reproduction* 52, 333–335.

Lewin, L.M., Weissenberg, R., Sobel, J.S., Marcus, Z., & Nebel, L. (1979). Differences in Concanavalin A-FITC Binding to Rat Spermatozoa During Epididymal Maturation and Capacitation. *Arch. Androl.* 2, 279–281.

Li, G., & Zhu, P. (2015). Structure and organization of chromatin fiber in the nucleus. *FEBS Lett.* 589, 2893–2904.

Li, S., & Pelletier, G. (1995). Involvement of serotonin in the regulation of GnRH gene expression in the male rat brain. *Neuropeptides* 29, 21–25.

Limón-Morales, O. (2011). Participación del 17β-estradiol y el receptor 5-HT<sub>1A</sub> en las alteraciones conductuales en un modelo animal de depresión. Tesis inedita de Maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.

Limón-Morales, O., Soria-Fregozo, C., Arteaga-Silva, M., Hernández González, M., Vázquez-Palacios, G., & Bonilla-Jaime, H. (2014). Hormone replacement with 17β-estradiol plus dihydrotestosterone restores male sexual behavior in rats treated neonatally with clomipramine. *Horm. Behav.* 66, 820–827.

Lisboa, S.F.S., Oliveira, P.E., Costa, L.C., Venâncio, E.J., & Moreira, E.G. (2007). Behavioral Evaluation of Male and Female Mice Pups Exposed to Fluoxetine during Pregnancy and Lactation. *Pharmacology* 80, 49–56.

Lohr, M., Kaltner, H., Schwartz-Albiez, R., Sinowatz, F., & Gabius, H.-J. (2010). Towards Functional Glycomics by Lectin Histochemistry: Strategic Probe Selection to Monitor Core and Branch-end Substitutions and Detection of Cell-type and Regional Selectivity in Adult Mouse Testis and Epididymis: Lectin Histochemistry of Adult Mouse Testis and Epididymis. *Anat. Histol. Embryol.* 39, 481–493.

Louik, C., Lin, A.E., Werler, M.M., Hernández-Díaz, S., & Mitchell, A.A. (2007). First-Trimester Use of Selective Serotonin-Reuptake Inhibitors and the Risk of Birth Defects. *N. Engl. J. Med.* 356, 2675–2683.

Lusem, N.D., De Larminat, M.A., Tezon, J.G., Blaquier, J.A., & Belocopitow, E. (1984). Androgen Dependence of Protein N-Glycosylation in Rat Epididymis \*. *Endocrinology* 114, 1448–1453.

Lyons, H.A., Thomas, J.S., Heurich, A.E., Shepherd, D.A., & Wetmore, S.D. (1976). Efficacy of doxycycline in acute infections of the lower respiratory tract. *Curr. Ther. Res. Clin. Exp.* 19, 24–31.

Maciag, D., Simpson, K.L., Coppinger, D., Lu, Y., Wang, Y., Lin, R.C.S., & Paul, I.A. (2006). Neonatal Antidepressant Exposure has Lasting Effects on Behavior and Serotonin Circuitry. *Neuropsychopharmacology* 31, 47–57.

Magon, N., & Kumar, P. (2012). Hormones in pregnancy. *Niger. Med. J.* 53, 179.

Malm, H., Artama, M., Gissler, M., & Ritvanen, A. (2011). Selective Serotonin Reuptake Inhibitors and Risk for Major Congenital Anomalies: *Obstet. Gynecol.* 118, 111–120.

Malone, D.A., & Dimeff, R.J. (1992). The use of fluoxetine in depression associated with anabolic steroid withdrawal: a case series. *J. Clin. Psychiatry* 53, 130–132.

Manfredi-Lozano, M., Roa, J., & Tena-Sempere, M. (2017). Connecting metabolism and gonadal function: Novel central neuropeptide pathways involved in the metabolic control of puberty and fertility. *Front. Neuroendocrinol.*

Marengo, S.R. (2008). Maturing the sperm: Unique mechanisms for modifying integral proteins in the sperm plasma membrane. *Anim. Reprod. Sci.* 105, 52–63.

Martínez Méndez, L., A. (2014). Determinación de marcadores serotoninérgicos en el testículo y epidídimo del murcielago *Myotis Velifer* durante su ciclo reproductivo. Tesis inedita de Maestría en Biología de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.

Martins, R.P., Ostermeier, G.C., & Krawetz, S.A. (2004). Nuclear Matrix Interactions at the Human Protamine Domain: A WORKING MODEL OF POTENTIATION. *J. Biol. Chem.* 279, 51862–51868.

Marty, M.S., Chapin, R.E., Parks, L.G., & Thorsrud, B.A. (2003). Development and maturation of the male reproductive system. *Birth Defects Res. B. Dev. Reprod. Toxicol.* 68, 125–136.

Meistrich, M.L., Hughes, T.J., & Bruce, W.R. (1975). Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. *Nature* 258, 145.

Meistrich, M.L., Hughes, T.H., & Bruce, W.R. (1975). Alteration of epididymal sperm transport and maturation in mice by oestrogen and testosterone. *Nature* 258, 145–147.

Mennigen, J.A., Lado, W.E., Zamora, J.M., Duarte-Guterman, P., Langlois, V.S., Metcalfe, C.D., Chang, J.P., Moon, T.W., & Trudeau, V.L. (2010). Waterborne fluoxetine disrupts the reproductive axis in sexually mature male goldfish, *Carassius auratus*. *Aquat. Toxicol.* 100, 354–364.

Micucci, H.A., & Camps, E. (1987). Lectinas: Obtención, Estructura Química, Propiedades y Aplicaciones Diagnósticas y Farmacológicas. *Acta Farm. Bonarense* 6, 35–54.

Millard, S.J., Weston-Green, K., & Newell, K.A. (2017). The effects of maternal antidepressant use on offspring behaviour and brain development: Implications for risk of neurodevelopmental disorders. *Neurosci. Biobehav. Rev.* *80*, 743–765.

Miller, D.J., Gong, X., & Shur, B.D. (1993). Sperm require beta-N-acetylglucosaminidase to penetrate through the egg zona pellucida. *Dev. Camb. Engl.* *118*, 1279–1289.

Misri, S., & Kostaras, X. (2002). Benefits and Risks to Mother and Infant of Drug Treatment for Postnatal Depression: *Drug Saf.* *25*, 903–911.

Mohammad-Zadeh, L.F., Moses, L., & Gwaltney-Brant, S.M. (2008). Serotonin: a review. *J. Vet. Pharmacol. Ther.* *31*, 187–199.

Monteiro Filho, W.O., Torres, S.M. de, Amorim, M.J.A.A.L., Andrade, A.J.M., Morais, R.N. de, Tenorio, B.M., & Silva Junior, V.A. da (2014). Fluoxetine induces changes in the testicle and testosterone in adult male rats exposed via placenta and lactation. *Syst. Biol. Reprod. Med.* *60*, 274–281.

Mori, K., Daitoh, T., Irahara, M., Kamada, M., & Aono, T. (1989). Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am. J. Obstet. Gynecol.* *161*, 207–211.

Moulsdale, W., & Hermann, S. (2008). In Utero Exposure to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors: Evidence for Poor Neonatal Adaptation. *Newborn Infant Nurs. Rev.* *8*, 123–130.

Müller, J.C., Imazaki, P.H., Boareto, A.C., Lourenço, E.L.B., Golin, M., Vechi, M.F., Lombardi, N.F., Minatovicz, B.C., Scippo, M.-L., Martino-Andrade, A.J., et al. (2012). In vivo and in vitro estrogenic activity of the antidepressant fluoxetine. *Reprod. Toxicol.* *34*, 80–85.

Müller, J.C., Boareto, A.C., Lourenço, E.L.B., Zaia, R.M., Kienast, M.F., Spencoski, K.M., Morais, R.N., Martino-Andrade, A.J., & Dalsenter, P.R. (2013). *In Utero* and Lactational Exposure to Fluoxetine in Wistar Rats: Pregnancy Outcomes and Sexual Development. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* *113*, 132–140.

Murray, J.F., Dakin, C.L., Siddiqui, A., Pellatt, L.J., Ahmed, S., Ormerod, L.J.A., Swan, A.V., Davies, D.C., & Wilson, C.A. (2004). Neonatal 5HT activity antagonizes the masculinizing effect of testosterone on the luteinizing hormone release response to gonadal steroids and on brain structures in rats. *Eur. J. Neurosci.* *19*, 387–395.

Nicolson, G.L., Usui, N., Yanagimachi, R., Yanagimachi, H., & Smith, J.R. (1977). Lectin-binding sites on the plasma membranes of rabbit spermatozoa. Changes in surface receptors during epididymal Maturation and after ejaculation. *J. Cell Biol.* *74*, 950–962.

Ohman, R., Hägg, S., Carleborg, L., & Spigset, O. (1999). Excretion of paroxetine into breast milk. *J. Clin. Psychiatry* 60, 519–523.

de Oliveira, W.M., de Sá, I.R., de Torres, S.M., de Moraes, R.N., Andrade, A.M., Maia, F.C.L., Tenorio, B.M., & da Silva Junior, V.A. (2013). Perinatal exposure to fluoxetine via placenta and lactation inhibits the testicular development in male rat offspring. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 59, 244–250.

Olson, G.E., & Danzo, B.J. (1981). Surface Changes in Rat Spermatozoa During Epididymal Transit<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* 24, 431–443.

Orgebin-Crist, M., Danzo, B., & Davies, J. (1975). Endocrine control of the development and maintenance of sperm fertilizing ability in the epididymis. *Handb. Physiol.* 5, 319–338.

Palego, L., Betti, L., Rossi, A., & Giannaccini, G. (2016). Tryptophan Biochemistry: Structural, Nutritional, Metabolic, and Medical Aspects in Humans. *J. Amino Acids* 2016, 1–13.

Patankar, A., & Parte, P. (2017). Sperm Chromatin Compaction and Male Infertility. In *Male Infertility: Understanding, Causes and Treatment*, R. SINGH, and K. Singh, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 295–315.

Pérez-Bautista, Y.L.P. (2018). Ciclo estral. concentración de estradiol y receptores a estrógenos ALFA en el útero y ovarios de la rata tratada neonatalmente con clomipramina (CMI). Tesis inedita de Maestría en Biología de la Reproducción Animal. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.

Plant, T.M. (2015). 60 years of neuroendocrinology: The hypothalamo-pituitary-gonadal axis. *J. Endocrinol.* 226, T41–T54.

Pollak Dorocic, I., Fürth, D., Xuan, Y., Johansson, Y., Pozzi, L., Silberberg, G., Carlén, M., & Meletis, K. (2014). A Whole-Brain Atlas of Inputs to Serotonergic Neurons of the Dorsal and Median Raphe Nuclei. *Neuron* 83, 663–678.

Pop, A., Lupu, D.I., Cherfan, J., Kiss, B., and Loghin, F. (2015). Estrogenic/antiestrogenic activity of selected selective serotonin reuptake inhibitors. *Clujul Med.* 1957 88, 381–385.

Prasad, P., Ogawa, S., & Parhar, I.S. (2015). Role of serotonin in fish reproduction. *Front. Neurosci.* 9.

Prevot, V. (2015). Puberty in Mice and Rats. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (Elsevier), pp. 1395–1439.

Prody, G.A., Greve, L.C., & Hedrick, J.L. (1985). Purification and characterization of an N-acetyl- $\beta$ -D-glucosaminidase from cortical granules of *Xenopus laevis* eggs. *J. Exp. Zool.* 235, 335–340.

- Pronina, T., Ugrumov, M., Adamskaya, E., Kuznetsova, T., Shishkina, I., Babichev, V., Calas, A., Tramu, G., Maily, P., & Makarenko, I. (2003). Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurones in rat fetuses. *J. Neuroendocrinol.* *15*, 549–558.
- Pyttel, S., Nimptsch, A., Böttger, J., Zschörnig, K., Jakob, U., Wegener, J., Müller, K., Paasch, U., & Schiller, J. (2014). Changes of murine sperm phospholipid composition during epididymal maturation determined by MALDI-TOF mass spectrometry. *Theriogenology* *82*, 396–402.
- Ramos, A.C., H. dos Santos, A., Silveira, K.M., Kiss, A.C.I., Mesquita, S.F.P., & Gerardin, D.C.C. (2016). Maternal treatment with fluoxetine promotes testicular alteration in male rat pups. *Reprod. Fertil. Dev.* *28*, 1206.
- Ramos Angrimani, D.S., Nichi, M., Losano, J.D.A., Lucio, C.F., Lima Veiga, G.A., Franco, M.V.M.J., & Vannucchi, C.I. (2017). Fatty acid content in epididymal fluid and spermatozoa during sperm maturation in dogs. *J. Anim. Sci. Biotechnol.* *8*.
- Ramos-Ibeas, P., Pericuesta, E., Fernandez-Gonzalez, R., Ramirez, M.A., & Gutierrez-Adan, A. (2013). Most regions of mouse epididymis are able to phagocytose immature germ cells. *Reproduction* *146*, 481–489.
- Rampono, J., Proud, S., Hackett, L.P., Kristensen, J.H., & Ilett, K.F. (2004). A pilot study of newer antidepressant concentrations in cord and maternal serum and possible effects in the neonate. *Int. J. Neuropsychopharmacol.* *7*, 329–334.
- Redondo-Figuero, C., & Viadero-Ubierna, M. (2008). Cambios hormonales en la pubertad. In *Atencion al adolescente*, (Ed. Universidad de Cantabria), pp. 18–22.
- Rejraji, H., Sion, B., Prensier, G., Carreras, M., Motta, C., Frenoux, J.-M., Vericel, E., Grizard, G., Vernet, P., & Drevet, J.R. (2006). Lipid Remodeling of Murine Epididymosomes and Spermatozoa During Epididymal Maturation<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* *74*, 1104–1113.
- Reynolds, A.B., Thomas, T.S., Wilson, W.L., & Oliphant, G. (1989). Concentration of Acrosome Stabilizing Factor (ASF) in Rabbit Epididymal Fluid and Species Specificity of Anti-ASF Antibodies<sup>1</sup>. *Biol. Reprod.* *40*, 673–680.
- Robaire, B., & Hamzeh, M. (2011). Androgen Action in the Epididymis. *J. Androl.* *32*, 592–599.
- Robaire, B., & Hinton, B.T. (2015). The Epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (Elsevier), pp. 691–771.
- Robaire, B., Hinton, B., & Orgebinchrist, M. (2006). The Epididymis. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*, (Elsevier), pp. 1071–1148.

Rodríguez-Tobón, A. (2011). Análisis macro y microestructural del epidídimo en relación con la maduración y almacenamiento de espermatozoides en el murciélago estacional *Corynorhinus mexicanus*. Tesis inedita de Maestría en Biología Experimental. Universidad Autónoma Metropolitana. Iztapalapa, México.

Rosano, G., Caille, A.M., Gallardo-Ríos, M., & Munuce, M.J. (2007). D-Mannose-binding sites are putative sperm determinants of human oocyte recognition and fertilization. *Reprod. Biomed. Online* 15, 182–190.

Runnebaum, I.B., Schill, W.B., & Töpfer-Petersen, E. (1995). ConA-binding proteins of the sperm surface are conserved through evolution and in sperm maturation. *Andrologia* 27, 81–90.

Safarinejad, M.R. (2008). Evaluation of Endocrine Profile and Hypothalamic-Pituitary-Testis Axis in Selective Serotonin Reuptake Inhibitor-Induced Male Sexual Dysfunction: *J. Clin. Psychopharmacol.* 28, 418–423.

Santra, R., Raychaudhuri, P., & Bagchi, C. (2013). Chronic fluoxetine treatment and sexual behavior in male and female albino rats. *Indian J. Pharmacol.* 45, 412.

Sarkar, M., Majumder, G.C., & Chatterjee, T. (1991). Goat sperm membrane: lectin-binding sites of sperm surface and lectin affinity chromatography of the mature sperm membrane antigens. *Biochim. Biophys. Acta* 1070, 198–204.

Sellami, A., Chakroun, N., Ben Zarrouk, S., Sellami, H., Kebaili, S., Rebai, T., & Keskes, L. (2013). Assessment of Chromatin Maturity in Human Spermatozoa: Useful Aniline Blue Assay for Routine Diagnosis of Male Infertility. *Adv. Urol.* 2013, 1–8.

Sethi, S., & Chaturvedi, C.M. (2009). Temporal synergism of neurotransmitters (serotonin and dopamine) affects testicular development in mice. *Zoology* 112, 461–470.

Shishkina, G., & Dygalo, N. (2000). Role of the serotonergic system in the acceleration of sexual maturation in wild Norway rats selected for reduced aggressiveness toward humans. *Comp. Biochem. Physiol. C Pharmacol. Toxicol. Endocrinol.* 125, 45–51.

Shum, W.W.C., Da Silva, N., McKee, M., Smith, P.J.S., Brown, D., & Breton, S. (2008). Transepithelial Projections from Basal Cells Are Luminal Sensors in Pseudostratified Epithelia. *Cell* 135, 1108–1117.

Shum, W.W.C., Da Silva, N., Brown, D., & Breton, S. (2009). Regulation of luminal acidification in the male reproductive tract via cell-cell crosstalk. *J. Exp. Biol.* 212, 1753–1761.

Silva, P.F.N., & Gadella, B.M. (2006). Detection of damage in mammalian sperm cells. *Theriogenology* 65, 958–978.

Silva Junior, V.A. da, Lins Amorim, M.J.A.A., Amorim Junior, A.A. de, Pinto, C.F., Deiró, T.B.J., Oliveira, J.R.M. de, Peixoto, C.A., & Manhães-de-Castro, R. (2008). Neonatal Administration of Fluoxetine Decreased Final Sertoli Cell Number in Wistar Rats. *Int. J. Morphol.* 26.

Silva Junior, V.A. da, Monteiro Filho, W.O., Pinto, C.F., Torres, S.M. de, & Tenorio, B.M. (2013). Testis evaluation of adult Wistar rats after neonatal treatment with fluoxetine. *Acta Sci. Biol. Sci.* 35.

de Siqueira Bringel, S., de Amorim Júnior, A.A., Amorim, M.J.A.A.L., Brito, L.T., Morais, R.N., de Torres, S.M., Tenorio, B.M., & da Silva Junior, V.A. (2013). Endocrine and testicular changes induced by olanzapine in adult Wistar rats: Endocrine and testicle changes induced by olanzapine in adult rats. *J. Appl. Toxicol.* 33, 24–31.

Sodhi, M.S., & Sanders-Bush, E. (2004). Serotonin and brain development. In *International Review of Neurobiology*, (Elsevier), pp. 111–174.

Sostaric, E., Aalberts, M., Gadella, B.M., & Stout, T.A.E. (2008). The roles of the epididymis and prostasomes in the attainment of fertilizing capacity by stallion sperm. *Anim. Reprod. Sci.* 107, 237–248.

Spigset, O., Carieborg, L., Ohman, R., & Norström, A. (1997). Excretion of citalopram in breast milk. *Br. J. Clin. Pharmacol.* 44, 295–298.

Spiro, R.G. (2002). Protein glycosylation: nature, distribution, enzymatic formation, and disease implications of glycopeptide bonds. *Glycobiology* 12, 43R–56R.

Srivastava, A., & Olson, G.E. (1991). Glycoprotein changes in the rat sperm plasma membrane during maturation in the epididymis. *Mol. Reprod. Dev.* 29, 357–364.

Sullivan, R., & Mieusset, R. (2016). The human epididymis: its function in sperm maturation. *Hum. Reprod. Update* 22, 574–587.

Sun, E.L., & Flickinger, C.J. (1979). Development of cell types and of regional differences in the postnatal rat epididymis. *Am. J. Anat.* 154, 27–55.

Sutovsky, P., Moreno, R., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Thompson, W.E., & Schatten, G. (2001). A putative, ubiquitin-dependent mechanism for the recognition and elimination of defective spermatozoa in the mammalian epididymis. *J. Cell Sci.* 114, 1665–1675.

Svingen, T., & Koopman, P. (2013). Building the mammalian testis: origins, differentiation, and assembly of the component cell populations. *Genes Dev.* 27, 2409–2426.

Tajiri, S., Fukui, T., Sawaguchi, A, & Yoshinaga, K. (2012). Cell- and region-specific expression of sugar chains in the mouse epididymal epithelium using lectin

histochemistry combined with immunohistochemistry. *Okajimas Folia Anat. Jpn.* 88, 141–146.

Tanaka, S.S., & Nishinakamura, R. (2014). Regulation of male sex determination: genital ridge formation and Sry activation in mice. *Cell. Mol. Life Sci.* 71, 4781–4802.

Tanghe, S., Van Soom, A., Duchateau, L., & de Kruif, A. (2004). Inhibition of bovine sperm-oocyte fusion by the p-aminophenyl derivative of D-mannose. *Mol. Reprod. Dev.* 67, 224–232.

Tao, J., Critser, E.S., & Critser, J.K. (1993). Evaluation of mouse sperm acrosomal status and viability by flow cytometry. *Mol. Reprod. Dev.* 36, 183–194.

Teclé, E., & Gagneux, P. (2015). Sugar-coated sperm: Unraveling the functions of the mammalian sperm glycocalyx: FUNCTIONS OF THE MAMMALIAN SPERM GLYCOCALYX. *Mol. Reprod. Dev.* 82, 635–650.

Tulsiani, D.R.P. (2006). Glycan-modifying enzymes in luminal fluid of the mammalian epididymis: An overview of their potential role in sperm maturation. *Mol. Cell. Endocrinol.* 250, 58–65.

Tulsiani, D.R.P., & Abou-Haila, A. (2012). Biological Processes that Prepare Mammalian Spermatozoa to Interact with an Egg and Fertilize It. *Scientifica* 2012, 1–12.

Tulsiani, D.R., Orgebin-Crist, M.C., & Skudlarek, M.D. (1998). Role of luminal fluid glycosyltransferases and glycosidases in the modification of rat sperm plasma membrane glycoproteins during epididymal maturation. *J. Reprod. Fertil. Suppl.* 53, 85–97.

Tulsiani, D.R.P., Skudlarek, M.D., Holland, M.K., & Orgebin-Crist, M.-C. (1993). Glycosylation of Rat Sperm Plasma Membrane during Epididymal Maturation. *Biol. Reprod.* 48, 417–428.

Vazquez, J.M., Martinez, E., Pastor, L.M., Roca, J., Matas, C., & Calvo, A. (1996). Lectin histochemistry during in vitro capacitation and acrosome reaction in boar spermatozoa: new lectins for evaluating acrosomal status of boar spermatozoa. *Acta Histochem.* 98, 93–100.

Verney, C., Lebrand, C., & Gaspar, P. (2002). Changing distribution of monoaminergic markers in the developing human cerebral cortex with special emphasis on the serotonin transporter. *Anat. Rec.* 267, 87–93.

Vieira, M.L., Hamada, R.Y., Gonzaga, N.I., Bacchi, A.D., Barbieri, M., Moreira, E.G., Mesquita, S. de F.P., & Gerardin, D.C.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, 102–107.

Wada, K., Hu, L., Mores, N., Navarro, C.E., Fuda, H., Krsmanovic, L.Z., & Catt, K.J. (2006). Serotonin (5-HT) Receptor Subtypes Mediate Specific Modes of 5-HT-Induced Signaling and Regulation of Neurosecretion in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Mol. Endocrinol.* *20*, 125–135.

Whitaker-Azmitia, P.M., Druse, M., Walker, P., & Lauder, J.M. (1996). Serotonin as a developmental signal. *Behav. Brain Res.* *73*, 19–29.

Whitfield, M., Pollet-Villard, X., Levy, R., Drevet, J.R., & Saez, F. (2015). Posttesticular sperm maturation, infertility, and hypercholesterolemia. *Asian J. Androl.* *17*, 742–748.

WHO. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen (Geneva: World Health Organization).

Yonkers, K.A., Blackwell, K.A., Glover, J., & Forray, A. (2014). Antidepressant Use in Pregnant and Postpartum Women. *Annu. Rev. Clin. Psychol.* *10*, 369–392.

Zeqiraj, A., Beadini, S., Beadini, N., Aliu, H., Gashi, Z., Elezaj, S., Bexheti, S., & Shabani, A. (2018). Male Infertility & Sperm DNA Fragmentation. *Open Access Maced. J. Med. Sci.* *6*, 1342–1345.

Zhou, W., De Iuliis, G.N., Dun, M.D., & Nixon, B. (2018). Characteristics of the Epididymal Luminal Environment Responsible for Sperm Maturation and Storage. *Front. Endocrinol.* *9*.

Zitta, K., Wertheimer, E.V., & Miranda, P.V. (2006). Sperm N-acetylglucosaminidase is involved in primary binding to the zona pellucida. *MHR Basic Sci. Reprod. Med.* *12*, 557–563.



Caso abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

### ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00394

Matrícula: 2161891725

EVALUACIÓN DE LA MADURACIÓN Y CALIDAD ESPERMÁTICA EPIDIDIMARIA EN RATAS MACHO ADULTAS EXPUESAS A FLUOKETINA DURANTE LA GESTACIÓN Y LACTANCIA.

UNIDAD

30 ENE 2019

COORDINACIÓN DE SISTEMAS ESCOLARES

En la Ciudad de México, se presentaron a las 14:00 horas del día 28 del mes de enero del año 2019 en la Unidad Intepelapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. EDITH ARENAS RIOS  
DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON  
DRA. TANIA MOLINA JIMENEZ  
DRA. IRMA JIMENEZ MORALES



KARINA HERNANDEZ SANTIAGO  
ALUMNA

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

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: KARINA HERNANDEZ SANTIAGO

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

REVISO

MTRA. ROSALIA SERRANO DE LA PAZ  
DIRECTORA DE SISTEMAS ESCOLARES

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

DIRECTORA DE LA DIVISION DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA



DRA. EDITH ARENAS RIOS

VOCAL

DR. AHIEZER RODRIGUEZ TOBON

VOCAL

DRA. TANIA MOLINA JIMENEZ

SECRETARIA

DRA. IRMA JIMENEZ MORALES