



# Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Evaluación del efecto de la Fluoxetina en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario de la rata hembra prepuber

## TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

## BIÓLOGA

PRESENTA:

Jessica Alemán Flores

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT, IN223714

México D.F. 2016





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

---

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Evaluación del efecto de la Fluoxetina en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario de la rata hembra prepuber

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA

Jessica Alemán Flores

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Tesis realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de Pubertad

Investigación realizada gracias al Programa UNAM-DGAPA-PAPIIT, IN223714

---



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
 "ZARAGOZA"  
 DIRECCIÓN

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
 P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **ALEMÁN FLORES JESSICA**, con número de cuenta **308030105**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **31 de mayo de 2016** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

**VOCAL** Dra. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

**SECRETARIO** M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

**SUPLENTE** Biól. MARÍA CRISTINA ALVARADO DOMÍNGUEZ

**SUPLENTE** Dra. JUANA MONROY MORENO

El título de la tesis que presenta es: **Evaluación del efecto de la Fluoxetina en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario de la rata hembra prepúber.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"**  
 México, D. F., a 26 de abril de 2016

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
 DIRECTOR



RECIBI  
 OFICINA DE EXÁMENES  
 PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
 M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
 JEFE DE CARRERA

# AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por todas sus enseñanzas y apoyo en la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. María Elena Ayala Escobar

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

Biol. María Cristina Alvarado Domínguez

Dra. Juana Monroy Moreno

Por su valiosa contribución y asesoría en la elaboración de esta tesis.

A la candidata a Doctor Jessica Romero Reyes, por su gran ayuda en el proceso experimental.

A Maribel, Adrián, Sandra, Nicté y Ana por formar un gran equipo de laboratorio y crean un buen ambiente de laboratorio.

A todos los miembros de la Unidad de Investigación de Biología de la Reproducción.

A todo el personal del Bioterio de la FES Zaragoza por su cooperación en el mantenimiento de los animales.

# DEDICATORIAS

*A mis padres María Teresa Flores y Juan Carlos Alemán, no tengo palabras para agradecer todo lo que me han dado y han sacrificado por mí, este logro es el reflejo de su esfuerzo y amor constante, los amo.*

*A mis abuelos Alicia Miranda y Benjamín Flores, gracias por todo el infinito amor que siempre me han dado, siempre me ha alentado a seguir adelante.*

*A mis tíos Angélica Flores y Antonio Flores, que han estado junto a mi desde antes de nacer y han seguido a mi lado apoyándome siempre que pueden los quiero.*

*A Armando Flores gracias por ser una inspiración y un excelente ejemplo a seguir, por guiarme orientarme y compartir conmigo tanto.*

*A mis hermanos Kenia y Carlos, gracias por ser, estar y existir.*

*A Beatriz gracias por estar todos estos años conmigo, escucharme y apapacharme en las buenas y en las malas... juntas hasta pasitas*

## Índice

RESUMEN .....	i
MARCO TEÓRICO .....	1
Aparato reproductor de la hembra .....	1
Ovogénesis .....	2
Foliculogénesis .....	3
Ovulación .....	5
Esteroidogénesis .....	6
Regulación de las Funciones del Ovario .....	9
Serotonina .....	11
Síntesis de Serotonina .....	12
Receptores .....	14
Fluoxetina .....	16
JUSTIFICACIÓN .....	19
HIPÓTESIS .....	20
OBJETIVO GENERAL .....	20
OBJETIVOS PARTICULARES .....	20
MATERIAL Y MÉTODO .....	21
Autopsia .....	21
Cuantificación de serotonina y de su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético por cromatografía de líquidos de alta presión .....	22
Estructura de ovario .....	23
Cuantificación de Gonadotropinas .....	24
Cuantificación de Hormonas Esteroides .....	25
Análisis Estadístico de los resultados .....	26
RESULTADOS .....	26
DISCUSIÓN .....	40
CONCLUSIONES .....	45
BIBLIOGRAFÍA .....	46

## RESUMEN

La serotonina (5-HT) se localiza en los tres componentes del eje reproductivo de la hembra, hipotálamo-hipófisis-ovario. Se le asocia con la modulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), de las gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH)] y en las funciones del ovario, ovulación y esteroidogénesis. En la actualidad se ha incrementado el uso de inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina, como la fluoxetina para atender problemas de depresión en los niños y adolescentes. Sin embargo, no se han considerado sus efectos en el aspecto reproductivo. Por ello, en el presente trabajo se analizaron los efectos de la administración de fluoxetina en la rata hembra prepúber en el inicio de la pubertad, primera ovulación, concentración de progesterona (P4) y de estradiol (E2) y de las gonadotropinas, así como en la estructura del ovario.

A ratas hembras de 30 días de edad se les inyectó por día 5 mg/kg de fluoxetina hidrociorada vía intraperitoneal desde el día 30 al el 33 (4 dosis, FLX4) o al 37 (siete dosis, FLX7). Como grupos de comparación se utilizaron animales sin tratamiento (TA) o a los que se les administró solución salina al 0.9 % (VH) siguiendo el esquema de tratamiento de la fluoxetina. Los animales se sacrificaron en el día del primer estro vaginal. Al momento de la autopsia se realizó la disección de los oviductos y se contó el número de ovocitos liberados. En el ovario izquierdo se cuantificó la concentración de 5-HT por cromatografía de líquidos de alta precisión y en el derecho se realizó el análisis de la estructura del ovario. La concentración de P4 y E2 se cuantifico por la técnica ELISA y las gonadotropinas por radioinmunoanálisis.

No se observaron diferencias significativas entre los grupos de animales a los que se les administraron 4 o 7 inyecciones de VH, por lo que los resultados en los diferentes parámetros se unieron para conformar un grupo con VH.

Las concentraciones de serotonina en el hipotálamo, la hipófisis y el ovario de los animales con FLX4 no se modificaron en comparación con el grupo de animales TA o con VH.

En el grupo de animales con FLX4 no se modificaron las edades de la apertura y primer estro vaginal, pero en los que se les inyectaron 7 dosis se presentó un retraso

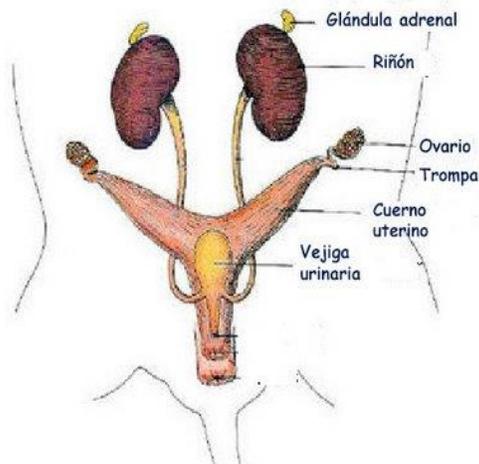
en la apertura vaginal ( $42.27 \pm 1.30$  vs.  $38.06 \pm 0.50$  días  $p < 0.05$ ) y del primer estro ( $43.09 \pm 1.2$  vs.  $39.06 \pm 0.50$   $p < 0.05$ ). En los animales con FLX4 no se modificó el número de animales que ovularon, pero el número de ovocitos liberados disminuyó significativamente ( $4.66 \pm 1.02$  vs.  $8.4 \pm 0.54$ ,  $p < 0.05$ ). En los que se les inyectaron 7 dosis de FLX no se modificó la ovulación.

La concentración de FSH, LH y E2 no se modificó, mientras que la de P4 disminuyó ( $9.93 \pm 1.76$  vs.  $15.44 \pm 1.39$  ng/ml suero  $p < 0.05$ ) En el grupo con FLX7 la concentración de FSH disminuyó significativamente ( $1.34 \pm 0.36$  vs.  $4.14 \pm 0.8$  ng/ml suero  $p < 0.05$ ) lo que se acompañó del incremento en el número de folículos preovulatorios atrésicos.

Conjuntamente estos resultados nos permiten sugerir que la inhibición de la recaptura de serotonina inducida por la administración de 7 dosis de fluoxetina, modifica el inicio de la pubertad, la estructura del ovario y la producción de FSH, mientras que la administración de 4 dosis de fluoxetina modifica la primera ovulación, la estructura del ovario y la producción de P4.

## MARCO TEÓRICO

### Aparato reproductor de la hembra



**Fig. 1 Aparato reproductor femenino en roedores tomado de:** <http://anatobioterio.blogspot.mx/2009/06/sistema-urogenital-de-la-rata.html>  
Consultado en noviembre de 2014.

En la hembra de los roedores el aparato reproductor está constituido por dos cuernos uterinos que se encuentran separados de la vagina por el cérvix. En el extremo de cada cuerno uterino se localizan los oviductos y ovarios (Fig. 1). Las funciones del ovario es de producir óvulos y liberar hormonas de origen proteico (inhibina y activina) y esteroide (progesterona (P4), testosterona y estradiol (E2)) (Knobil y Neill, 1998; Findlay *et al.*, 2000).

Los ovarios se encuentran fijos a ambos lados del útero por los ligamentos útero-ováricos y a la pared pélvica por los infundíbulos pelvianos, mediante medios de sujeción como son: 1) El ligamento suspensorio del ovario (lumboovárico) que conduce los vasos sanguíneos, linfáticos y los nervios. Se extiende desde los procesos transversos de las últimas vértebras lumbares al polo superior del ovario. 2) El ligamento propio del ovario, útero ovárico, comunica el extremo proximal (uterino) del ovario al ángulo lateral del útero. 3) El mesovario constituido por un corto repliegue peritoneal que contiene vasos que irrigan el ovario y está formado por la aleta posterior del ligamento ancho. 4) El ligamento tuboovárico que fija el ovario a la franja ovárica de la trompa (Moore *et al.*, 2010).

El ovario es el órgano primario del aparato reproductor de la hembra y está formado por una región central o médula y una externa o corteza. La médula contiene tejido conjuntivo laxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios, mientras que en la

corteza se encuentran los folículos ováricos en las diferentes etapas del desarrollo (Ross *et al.*, 2004).

## **Ovogénesis**

La ovogénesis y foliculogénesis son procesos que ocurren simultáneamente en el ovario, y la progresión de ambos eventos se lleva a cabo de forma coordinada para lograr el desarrollo de un ovocito y su expulsión durante la ovulación. La ovogénesis consiste en una complicada serie de cambios bioquímicos, genéticos y estructurales de la célula germinal, que se inician en estadios muy tempranos del desarrollo embrionario y pueden terminar años después, en hembras sexualmente maduras. La foliculogénesis es el proceso de formación y maduración de los folículos donde se alberga el ovocito y se convierte en gameto viable para su fecundación (Wassarman y Albertini, 1994).

Durante las primeras etapas de desarrollo embrionario, las células somáticas del endodermo dorsal en el saco vitelino migran desde el intestino posterior hasta las gónadas en desarrollo. Estas células germinales se multiplican por mitosis y una vez que han alcanzado la cresta gonadal se denominan ovogonias (células diploides). Las crestas gonadales están constituidas principalmente por mesénquima y células de origen mesonefrítico. Las ovogonias al llegar a esta zona se asocian con las células somáticas, continuando el desarrollo y quedando envueltas completamente por una capa de células pregranulosas (Baker, 1982; Byskov y Hoyer, 1988).

Las ovogonias continúan multiplicándose por división mitótica; esta proliferación culmina cuando comienza la meiosis. El tiempo de multiplicación por mitosis de las ovogonias es diferente en cada especie. En los fetos humanos, este proceso se da hasta el segundo y tercer trimestre de embarazo (Baker, 1982; Byskov y Hoyer, 1988).

Al iniciar la meiosis, la ovogonia se transforma en ovocito y tanto las células germinales primordiales como las células somáticas contienen un número diploide

(2n). Mediante la meiosis se producen gametos con una dotación haploide (n), de forma que durante la reproducción sexual, los gametos se unen para reconstituir una dotación diploide de cromosomas (Klug y Cummings, 1999). Las ovogonias que inician la meiosis se denominan ovocitos primario; cuando el ovocito transcurre por la primera división meiótica se le denomina ovocito primario, mientras que durante la meiosis II se le llama ovocito secundario (Masui, 2000).

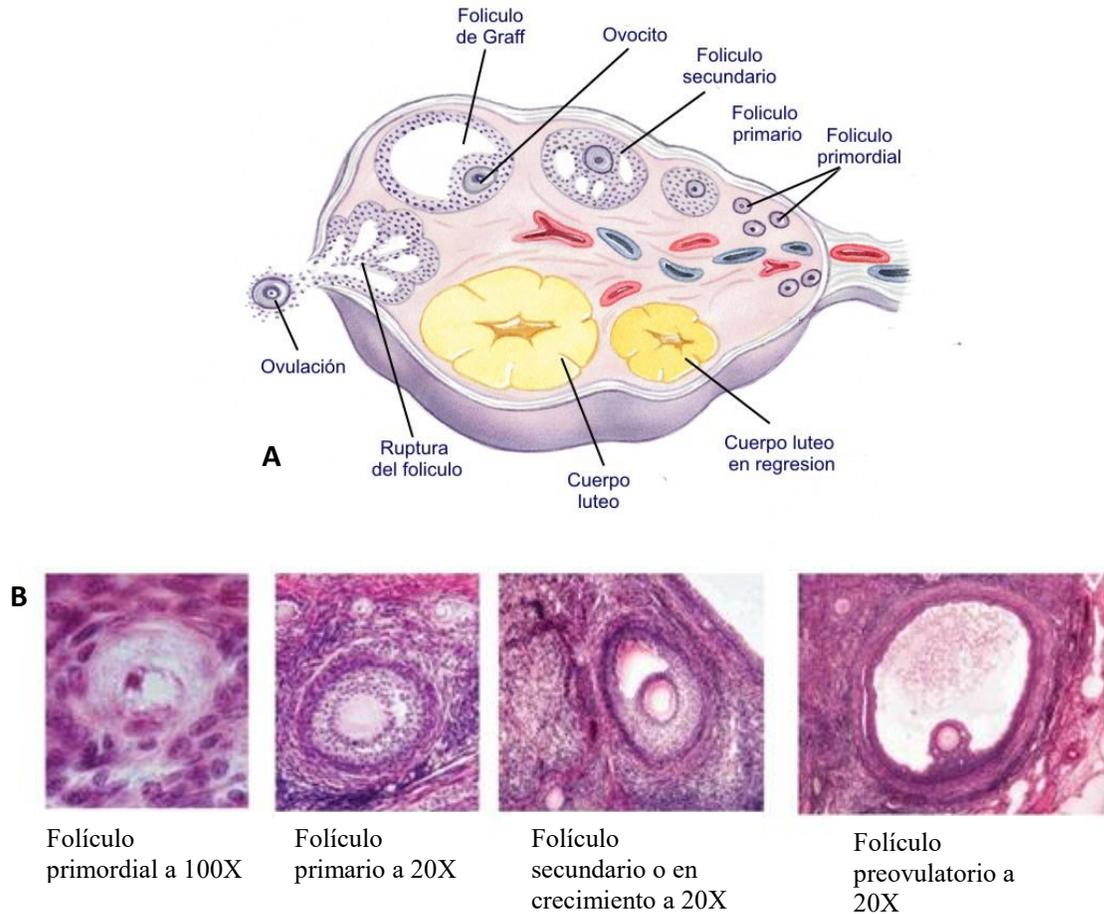
El ovocito secundario, que se encuentra en metafase de la segunda división meiótica, se considera maduro, es decir, capaz de ser fecundado y detiene la evolución de la meiosis hasta la penetración del espermatozoide. Esto significa que, a menos que se produzca la fecundación, la meiosis no se completará y el ovocito secundario degenerará como una célula diploide al no culminar la segunda división meiótica (Polanski y Kubiak, 1999).

### **Foliculogénesis**

Estos folículos pasan por diferentes etapas de desarrollo (Fig. 2), las cuales son clasificados según su morfología, el tipo y número de células que los componen, en folículos primordiales, folículos primarios, folículos en crecimiento (secundarios o preantrales y antrales) y los folículos preovulatorio (Tortora y Derrickson, 2006).

Los folículos en los estadios más tempranos de desarrollo y pequeños, los primordiales son los más abundantes. Están compuestos por un ovocito detenido en profase I, de la primera división meiótica, rodeado por una capa plana de células aplanadas o de la pregranulosa. Su diámetro es de aproximadamente 30-60  $\mu\text{m}$  y contienen un ovocito diploide con un diámetro de 9- 25  $\mu\text{m}$  (Hirshfield, 1991). Las células de la pregranulosa se tornan cúbicas y mediante mitosis dan origen a diferentes capas de la granulosa convirtiéndose así en folículos en crecimiento. Conforme el folículo se desarrolla, a partir del tejido conjuntivo que rodea a los folículos se forman

las células de la teca, que se divide en teca interna y teca externa (Ross *et al.*, 2004; Wassarman *et al.*, 1996).



**Fig. 2. (A) Esquema de ovario donde se muestran los diferentes compartimientos del órgano, (B) cortes histológicos de folículos primordiales, primarios, en crecimiento y preovulatorios.** Modificado de: <http://image.slidesharecdn.com/histologadelosgenitalesmasculinosyfemeninos-120512140244-phpapp01/95/histologa-de-los-genitales-masculinos-y-femeninos-8-728.jpg?cb=1336831475> modificado. Consultado septiembre de 2015

El crecimiento simultáneo del ovocito y el folículo se presenta en el estadio de folículo secundario, momento en que el ovocito alcanza el tamaño máximo de 70  $\mu\text{m}$  de diámetro en el caso de los roedores. De allí en adelante, el ovocito no crece y el aumento del diámetro folicular depende del crecimiento y proliferación de las células foliculares y de la aparición del antro. La teca interna se forma hacia el final del estadio

del folículo primordial y la teca externa aparece a medida que el folículo crece y comprime el estroma circundante (Rajkovic *et al.*, 2006). Entre las células que se multiplican aparecen cavidades que contienen líquido folicular. Las diferentes cavidades al unirse constituyen una sola cavidad y forman el antro folicular. Luego de la aparición del antro folicular, las células de la granulosa se comienzan a diferenciar funcionalmente, de acuerdo a su localización dentro del folículo en dos poblaciones: murales y del cumulus, las células que rodean al ovocito forman el cumulus oophorus, mientras que las células de la granulosa que recubren la membrana basal se llaman células de la granulosa mural (Zoller y Weisz, 1978; Tortora y Derrickson, 2006, Rajkovic *et al.*, 2006).

El folículo preovulatorio lo forman el ovocito, las células de la granulosa, la lámina basal que las rodea y las separa de las células de la teca. Los vasos sanguíneos y linfáticos irrigan a la teca y no llegan a la capa de la granulosa (Riboni, 1998). En estas células la hormona estimulante del folículo (FSH) tiene sus receptores, en donde favorece el desarrollo y proliferación de las células de la granulosa y así como la síntesis de estrógenos (Ross *et al.*, 2004).

En las células de la teca interna se expresan los receptores a la hormona luteinizante (LH), el estímulo por parte de esta hormona desencadena la síntesis y secreción de los andrógenos los cuales pasan a las células de la granulosa en las que se expresan los receptores para la FSH y como resultado de la acción de esta hormona, los andrógenos se transforman a estrógenos, los cuales actúan en el propio ovario modulando el desarrollo del folículo o salen a circulación general con la finalidad de ser transportados a sus diferentes órganos blanco, como el útero (Ross *et al.*, 2004).

## **Ovulación**

Una vez que el folículo maduro alcanza la etapa de preovulatorio, se produce su ruptura y se libera el oocito conjuntamente con el cumulus oophorus que lo rodea, a esto se le denomina ovulación y se inicia cuando la secreción de LH llega al valor máximo. El folículo roto en el momento de la ovulación, se llena de sangre formando

lo que se conoce como cuerpo hemorrágico, las células de la teca y la granulosa que revisten al folículo proliferan rápidamente y la sangre coagulada es sustituida por células lúteas, formando el cuerpo lúteo, del cual sus células secretan estrógenos y progesterona (Barrett *et al.*, 2010).

La ruptura de la membrana folicular parece ocurrir por acción de un activador del plasminógeno presente en el líquido folicular, que cataliza la conversión del plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica que rompe la membrana basal. El proceso de la ruptura folicular es mediado por una especie de “reacción inflamatoria” local dependiente de histamina, por colagenasas y por las prostaglandinas (Tresguerres y Castillo, 2000).

En las diferentes especies de mamíferos ocurren dos patrones de ovulación: en el primero la estimulación física del cuello uterino producida por el apareamiento desencadena una secreción de gonadotropinas, que hacen que el desarrollo del folículo continúe y concluya. Este mecanismo de ovulación ocurre en conejos, gatos y otros carnívoros que son reconocidos por su alta tasa reproductiva en relación con otros mamíferos. En el otro patrón, son los ovuladores espontáneos, donde los factores ambientales, como la cantidad de luz y otros factores modulan la secreción de gonadotropinas, FSH y LH esenciales en la maduración del folículo y la ovulación. (De Alba, 1970), el caso de la rata, la ovulación se produce en el día del estro y la periodicidad de los eventos que conducen a la ovulación se repiten cada 4 o 5 días dependiendo de la cepa de rata (Ojeda y Skinner, 2006).

### **Esteroidogénesis**

Las hormonas producidas en el ovario son fundamentalmente el estradiol y la progesterona, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstendiona, testosterona, 17-hidroxiprogesterona. El estradiol es un factor de que induce la mitosis y sobrevivencia de las células de la granulosa, que conducen al crecimiento del folículo (Tresguerres y Castillo, 2000).

El sitio de producción de estradiol y testosterona en el ovario son las células de la granulosa y de la teca respectivamente, que poseen el sistema enzimático complementario requerido para la formación de tales hormonas (Tresguerres y Castillo, 2000; Irusta, 2008).

Los esteroides derivan del colesterol, que se obtiene a partir de tres fuentes: el que circula en la sangre en forma de lipoproteínas, el que se sintetiza de novo dentro del ovario a partir de acetil coenzima A y el que se libera de los ésteres del colesterol almacenados intracelularmente (Figura 3) (Tresguerres y Castillo, 2000).

La anatomía vascular de los componentes celulares del ovario influye en cuanto a la posible utilización de las lipoproteínas como fuente de colesterol. Las células de la teca interna tienen acceso a las lipoproteínas ya que se encuentran muy vascularizadas, contrariamente a lo que sucede con las células de la granulosa, las cuales se encuentran aisladas de los capilares sanguíneos debido a la membrana basal que funciona como barrera a distintas moléculas (Irusta, 2008).

El colesterol es transportado al interior de las células esteroideogénicas por un proceso de endocitosis mediado por receptores asociados a la membrana plasmática. Para comenzar la síntesis de esteroides, el colesterol atraviesa la membrana de la mitocondria, y de esta forma entra en contacto con la proteína CYP11A (P450 scc o citocromo del clivaje de la cadena lateral del colesterol). Este proceso es llevado a cabo por la proteína reguladora de la esteroideogénesis (StAR) (Yen *et al.*, 2001).

El primer paso de conversión del colesterol, consiste en la ruptura de la cadena lateral del colesterol (unión C-20,22) resultando en un compuesto de 21 carbonos, la pregnenolona, que sale de la mitocondria y en el retículo endoplásmico liso (REL) es convertida en progesterona por la acción de la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/delta4-delta5 isomerasa (3 $\beta$ -HSD) (Yen *et al.*, 2001).

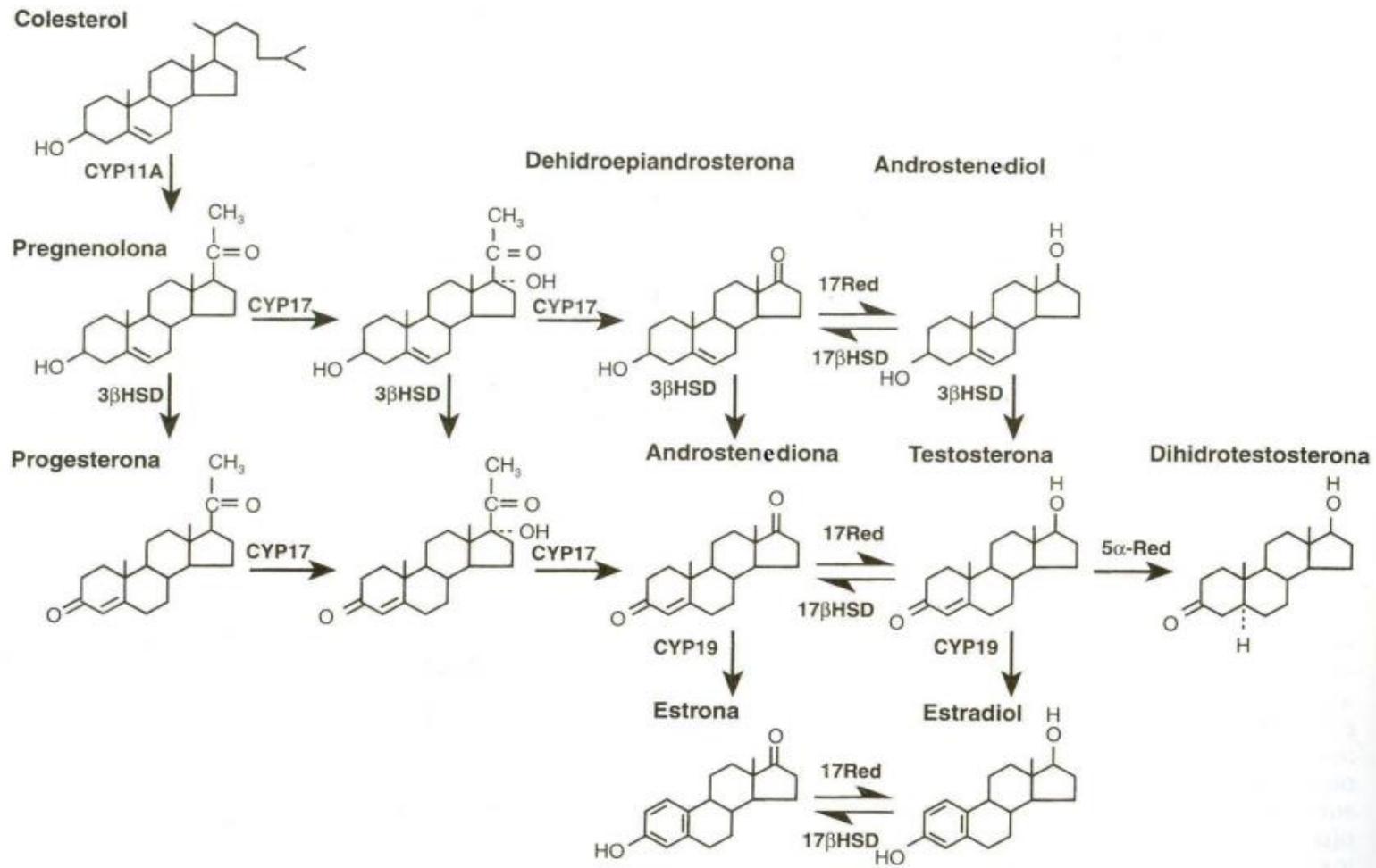


Figura 3.- Síntesis de hormonas esteroideas, Citocromo del clivaje de la cadena lateral del colesterol (CYP11A), 17a hidroxilasa /C-17,20 liasa (CYP17), 3b-hidroxiesteroide deshidrogenasa/delta4-delta5 isomerasa (3b-HSD), Enzima aromatasa (CYP19), Enzima 17 reductasa (17 red), 17b-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17b-HSD), Enzima 5a-reductasa (5a-red) (Yen et al., 2001).

La biosíntesis de hormonas esteroides sigue después la vía  $\Delta$ -4 en el cuerpo lúteo que lleva aparejada la conversión de pregnenolona a progesterona mientras que en el folículo es preferente la vía  $\Delta$ -5 ya que las células tecales son capaces de metabolizar más eficientemente la 17-hidroxipregnenolona que la 17-hidroxiprogesterona. El último paso para la biosíntesis de los estrógenos es la aromatización del anillo A de los andrógenos utilizando la enzima CYP 19 aromatasa, enzima que transforma los andrógenos a estrógenos (Tesguerres y Castillo, 2000).

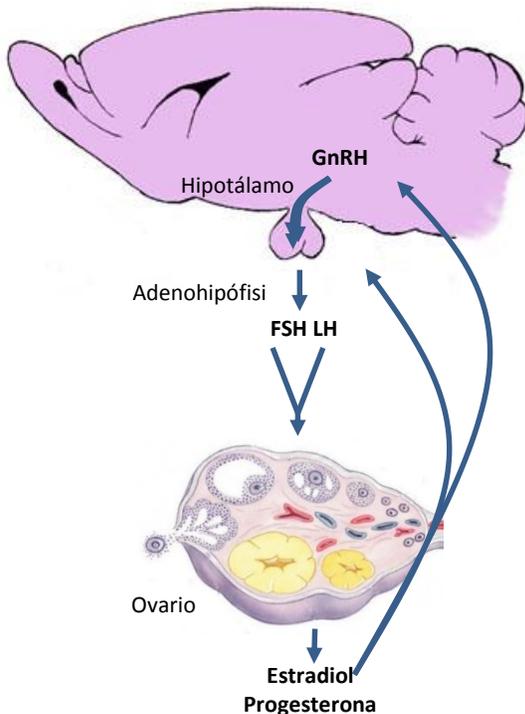
La producción de esteroides está en función del contenido de cuatro enzimas clave, como el CYP desramificante, la 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ -HSD), la CYP 17-hidroxilasa y la CYP 19 P450-aromatasa. Estas enzimas catalizan la conversión de colesterol a pregnenolona, de pregnenolona a progesterona, de pregnenolona a andrógenos y finalmente el último, de los andrógenos a estrógenos (Tesguerres y Castillo, 2000).

Las células de la teca interna poseen receptores a la hormona luteinizante, los cuales al activarse actúan vía la producción del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) que activa los complejos enzimáticos que transforman el colesterol en testosterona. Por su parte en las células de la granulosa la FSH al interactuar con receptores que favorecen la producción del AMPc y como consecuencia se activa a la CYP19 aromatasa favoreciendo así la producción de estrógenos a partir de andrógenos, los que actúan en el propio folículo o salen a la circulación. Cerca de 2% del estrógeno circulante se encuentra libre y el resto se enlaza a proteínas: 60% a albúmina y 38% a la misma globulina fijadora de esteroides gonadales (GBG) que se une a la testosterona (Fernández y Mangel, 1983; Barrett *et al.*, 2010).

## **Regulación de las Funciones del Ovario**

Durante el desarrollo del folículo intervienen las gonadotropinas FSH y LH, especialmente la FSH, aunque el crecimiento del folículo primordial es independiente

de las gonadotropinas ya que estos folículos no poseen receptores para estas hormonas. Aunque los receptores a las gonadotropinas se expresan en el folículo hasta la etapa secundaria, las células de la pregranulosa y los folículos primordiales responden a factores que inducen a la formación del AMPc, por lo que estos activan vías de señalización que juegan un papel importante en la diferenciación de este tipo de folículos (Mayerhofer *et al.*, 1997).



**Figura 4.- Eje hipotálamo-hipófisis-ovario**

Además de las gonadotropinas, los factores de crecimiento que participan en la regulación del desarrollo folicular son: El factor de crecimiento y diferenciación-9 (GDF-9), perteneciente a la familia de los factores de crecimiento transformantes- $\beta$  (TGF- $\beta$ )/Activina, producido por el ovocito; el factor de crecimiento de fibroblasto-7 (FGF-7 o KGF), secretado por las células mesenquimales precursoras de las células de la teca; Factor similar a Insulina-I (IGF-I), aumenta la respuesta a FSH en las células de la granulosa estimulando la expresión de su receptor en este tipo celular. El IGF-I también estimula la expresión de proteínas involucradas en la síntesis de esteroides

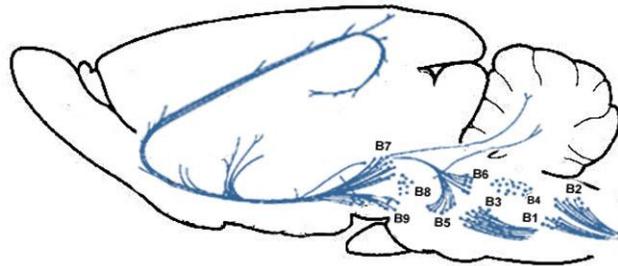
como StAR y la CYP19 indispensables en la esteroidogénesis (Irusta, 2008).

La producción de FSH y LH es modulada por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). En el hipotálamo existen grupos de neuronas que secretan la GnRH al sistema portal hipotalámico-hipofisario y es transportado hasta la adenohipófisis, en donde estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas (Figura 4). A su vez la producción de GnRH es modulada por sistemas de neurotransmisión, como la serotonina (5-HT) y por los estrógenos, los que ejercen sus efectos en el

hipotálamo y en la hipófisis y como consecuencia en la secreción de las gonadotropinas (Prieto y Velázquez, 2002; Tresguerres y Castillo, 2000).

## Serotonina

Serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) es un neurotransmisor que se sintetiza a partir de un aminoácido, el L-triptofano. Se localiza en diferentes regiones del cerebro como el hipotálamo (Baumel, 1997), en los oviductos, útero y ovario de varias especies de roedores como la rata, hámster y ratón (Dubé y Amireault, 2007).



**Figura 5.- Sistema serotoninérgico en cerebro de rata señalando los núcleos del rafe modificado de:**  
[http://www7.uc.cl/sw\\_educ/neurociencias/html/099](http://www7.uc.cl/sw_educ/neurociencias/html/099).

En sistema nervioso central (SNC) la serotonina es producida en un grupo de neuronas, cuyos somas se agrupan y conforman el núcleo del rafé en la región del cerebro medio. Los axones de las neuronas de los núcleos del rafé se proyectan a la médula espinal y a diferentes regiones del cerebro, corteza cerebral, hipotálamo, hipocampo y amígdala tálamo (George y Siegel, 1999). En órganos periféricos se le localiza en la hipófisis, el páncreas, el pulmón, el timo, la tiroides, el epidídimo, testículo, ovario, en la mucosa gastrointestinal, las plaquetas y los mastocitos (Tinajero *et al.*, 1993; Dubé y Amireault 2007).

La serotonina participa en la regulación de las funciones del ovario y en particular de la esteroidogénesis, esta amina actúa en el eje hipotálamo-hipófisis modulando la secreción de las gonadotropinas, la producción de andrógenos y estrógenos por el ovario (Justo *et al.*, 1989; Vitale y Chiochio, 1993). La serotonina en el ovario actúa directamente en la modulación de la secreción de hormonas esteroides, esenciales en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento de los

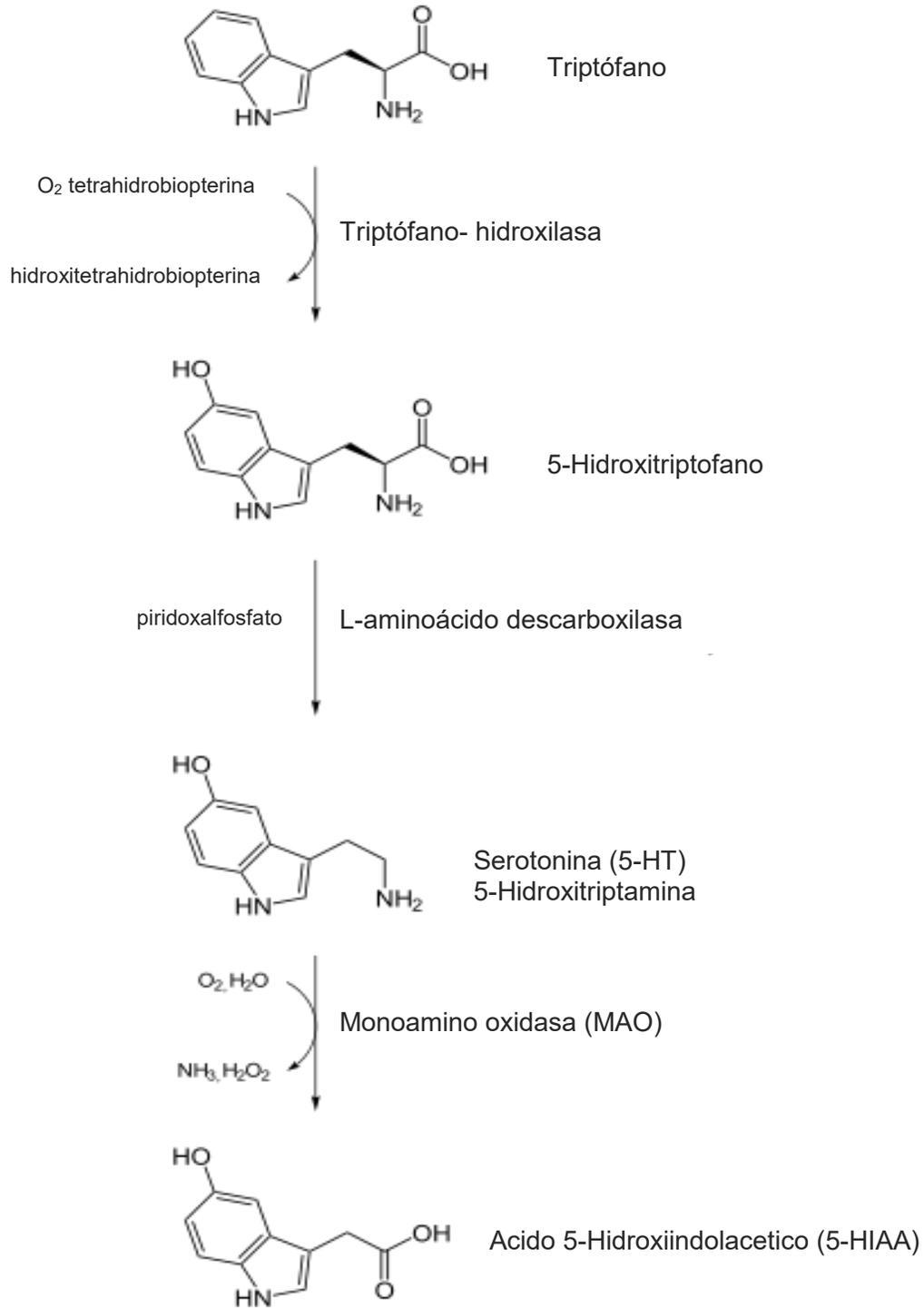
diferentes componentes del aparato reproductor de la hembra (Tanaka *et al.*, 1993).

### **Síntesis de Serotonina**

Se sintetiza a partir del aminoácido, triptófano, que es transportado desde la sangre al cerebro y es incorporado por las neuronas serotoninérgicas (Figura 5), en donde se lleva a cabo su hidroxilización por la acción de la enzima, triptofano hidroxilasa (TPH) y forma el 5-hidroxitriptofano, (5-HTP), paso limitante en la síntesis de serotonina. Este último compuesto por acción de la enzima descarboxilasa se transforma en serotonina (Figura 6) (Frazer y Hensler 1999).

Se han descrito dos isoformas de la triptofano hidroxilasa la THP1 y THP2. La 1 se localiza en el cromosoma 11 cuyo gen consiste en 10 exones que da lugar a una proteína final con 444 aminoácidos, se expresa en la mayoría de los tejidos periféricos productores de serotonina: piel, intestino, glándula pineal, en el ovario y en menor proporción se expresa en el SNC (Walther y Bader, 1999; Walther y Bader, 2003; Dubé y Amireault, 2007). La TPH2 es localizada en el cromosomas 12 con 11 exones y una longitud final de 490 aminoácidos y se expresa principalmente en el SNC (Walther y Bader, 2003).

La serotonina que se libera y que no interactúa con su receptor en la hendidura presináptica, se une a la proteína transportadora Slc6A4, comúnmente llamada SERT (Dubé y Amireault, 2007), perteneciente al grupo de transportadores neuronales de membrana de sustrato específico Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup> dependiente y a la familia de genes SLC6 (Moya, 2014), se expresa en las neuronas del SNC, y en ovocitos, embriones tempranos y células del cumulus (Dubé y Amireault 2007).



**Figura 6.- Síntesis de serotonina a partir de L- triptófano. Modificado de (Barrett *et al.*, 2010).**

En el humano, el gen SLC6A4 codifica para SERT, es una región de aproximadamente 40 kb. Localizado en el cromosoma 17q11.2 y se compone de 14 exones, la secuencia de su transcrito predice una proteína de 630 aminoácidos con 12 dominios transmembranales (Moya, 2014). La función de la SERT es transportar a la serotonina desde el compartimiento extracelular al interior; de esta manera la 5-HT entra a la mitocondria de la neurona, en donde es metabolizada por la enzima monoamino oxidasa (MAO), para formar el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabolito de la serotonina (Frazer y Hensler, 1999).

## Receptores

La serotonina presenta una gran diversidad de efectos que son mediados por su unión a diversos receptores específicos de membrana. Tanto la 5-HT como sus receptores están presentes en el SNC, y en el sistema nervioso periférico y tejidos periféricos como el intestino, sistema cardiovascular, células sanguíneas y en el ovario (Iceta, 2008). En mamíferos se han identificado siete familias de receptores a serotonina de la 5-HT<sub>1</sub> a la 5-HT<sub>7</sub>, compuestos por 14 subtipos (Hoyer y Martin, 1997; Linder *et al.*, 2007).

A la serotonina se le asocia con la regulación del funcionamiento del sistema cardiovascular, digestivo, el apetito, la actividad locomotora, la temperatura corporal, sueño. También en la conducta sexual y función endocrina, debido a que actúa en el eje hipotálamo-hipófisis y modula la secreción de factores liberadores por el hipotálamo y de hormonas como la FSH y LH por la hipófisis (Justo *et al.*, 1989; Vitale y Chiochio, 1993; Hoaki *et al.*, 2011; Monti, 2011). Las alteraciones en la secreción de la amina se asocia con algunos desordenes de la conducta (Cadoret *et al.*, 2003; Golubchik *et al.*, 2009) (Cuadro 1).

La serotonina interviene en la modulación de las funciones reproductivas, como la regulación de la secreción de GnRH y LH, la maduración gonadal y comportamientos socio-sexuales (Li y Pelletier, 1995; Bethea *et al.*, 1999; Lu *et al.*, 2003; Overgaard, 2013).

**Cuadro 1.-Alteraciones de la conducta o trastornos en la fisiología ocasionados por cambios en la concentración de serotonina**

Padecimiento	Concentración de serotonina en SNC	Síntomas
Síndrome serotoninérgico	Muy alta	Alteraciones mentales, hiperactividad autonómica y trastornos neuromusculares. Las alteraciones mentales pueden ser intranquilidad, agitación, confusión, desorientación y hasta coma. Entre los síntomas de hiperactividad autonómica destacan la fiebre, taquicardia, diarrea, vómitos, diaforesis y dilatación pupilar. Los trastornos neuromusculares más comunes son: temblores, mioclonías, rigidez, hiperreflexia y ataxia (Boyer y Shannon, 2005).
Bulimia nerviosa	Bajas	Establece relaciones entre los trastornos de la conducta alimentaria impulsividad, agresividad e intentos de suicidio (Zitterl <i>et al.</i> , 2000).
Anorexia nerviosa	Altas	Tendencia al perfeccionismo, ideas obsesivas y pérdida del apetito (Zitterl <i>et al.</i> , 2000).
Depresión	Bajas	Estado de ánimo irritable o bajo la mayoría de las veces. Pérdida de placer en actividades habituales. Dificultad para conciliar el sueño o exceso de sueño, entre otras (Zitterl <i>et al.</i> , 2000).
Trastorno obsesivo compulsivo	Bajas	Ansiedad, inquietud, aprensión, temor o preocupación, y conductas repetitivas, denominadas compulsiones dirigidas a reducir la ansiedad asociada (Zitterl <i>et al.</i> , 2000).

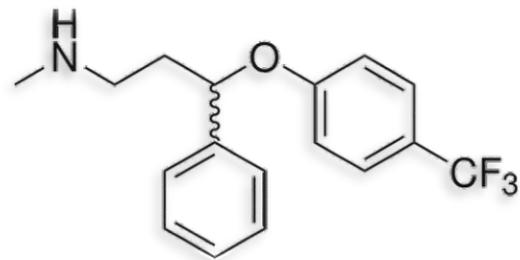
La serotonina participa en la modulación neuroendocrina del eje reproductor y las hormonas esteroides, E2 y P4 modulan el funcionamiento de este sistema, debido a que en las regiones del cerebro que reciben inervación serotoninérgica se encuentran receptores a las hormonas esteroides antes mencionadas. Además se plantea que la serotonina regula el funcionamiento del ovario, la secreción de hormonas esteroides sexuales y la maduración sexual en la rata, vía la producción de la GnRH y de las gonadotropinas (Li y Pelletier, 1995; Eyal *et al.*, 1996; Belthea *et al.*, 1998). En apoyo a la idea de que la serotonina actúa en el ovario se han identificado algunos marcadores del sistema serotoninérgico, la TPH, la SER y los receptores 5-HTD y 5-

HT7 en el ovocito y en las células del cumulus oophorus (Dubé y Amireault, 2007; Henriksen *et al.*, 2012).

## Fluoxetina

La fluoxetina es un medicamento del grupo de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (SSRI, por sus siglas en inglés) (Figura 7). También se le conoce como 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-N-methyl-3-phenylpropylamine (Wong *et al.*, 1974). Actúa aumentando las concentraciones de serotonina en la hendidura sináptica (Borg y Brodin, 1996).

Los SSRI son estructuralmente diferentes entre sí, pero comparten el mismo mecanismo de acción (Figura 8) el cual consiste en su unión a la SERT, que conduce a la inhibición de la recaptura de serotonina, lo que aumenta su concentración en el espacio sináptico y aumenta la transmisión serotoninérgica (Wong, 2005). Además no tienen efectos inhibitorios en los receptores histaminérgicos, adrenérgicos, serotoninérgicos, dopaminérgicos o colinérgicos, brindando una gran seguridad en su manejo (Flórez *et al.*, 2003).



**Figura 7.- Estructura química de la fluoxetina.** Modificado de Wong *et al.*, 1974.

Se ha mostrado que la vida media de la fluoxetina es de 1 a 3 días, mientras que su metabolito la norfluoxetina tiene una vida media de 4 a 16 días (Qu *et al.*, 2009). La fluoxetina se une en un 95% a las proteínas plasmáticas y se distribuye por todo el organismo, cruza la barrera hematoencefálica y la placentaria. También se excreta en la leche materna (Baldessarini y Tarazi, 2001).

La FLX se usa para tratar la depresión, el trastorno obsesivo-compulsivo (pensamientos perturbadores que no desaparecen y la necesidad de realizar ciertos actos una y otra vez), algunos trastornos de la alimentación como anorexia nerviosa y

bulimia nerviosa, y ataques de pánico (ataques súbitos e inesperados de terror extremo y la preocupación que tales ataques generan). También se usa para aliviar los síntomas del trastorno disfórico premenstrual, incluidos los cambios repentinos del estado de ánimo, la irritabilidad, la inflamación y el aumento de la sensibilidad de los senos (Wong *et al.*, 2005; AHFS® Consumer Medication Information, 2014).

En personas con depresión, bulimia nerviosa o trastorno obsesivo compulsivo, se considera que la dosis efectiva de fluoxetina para atender estos problemas de salud es de 20 mg/día, la cual bajo prescripción médica la pueden elevar hasta 80 mg/día después de varias semanas de haber iniciado su consumo y cuando no se observa mejoría en los pacientes (Rossi *et al.*, 2004; AHFS® Consumer Medication Information, 2014). Cuando se excede la dosis recomendada se produce náuseas, vomito, ansiedad, insomnio, disminuye el peso corporal y convulsiones (Rossi *et al.*, 2004; AHFS® Consumer Medication Information, 2014).

**Cuadro 2. Presentaciones comerciales de la fluoxetina**

<b>Denominación</b>	<b>Forma</b>	<b>Presentación</b>
<b>Genérica</b>	<b>Farmacéutica</b>	
FLUOXETINA	tabletas	20 mg envase con 14 tabletas
FLUOXETINA	cápsulas	20 mg envase con 14 cápsulas
FLUOXETINA	cápsulas	20 mg caja con 14 cápsulas
FLUOXETINA	cápsulas	20 mg envase con 14 cápsulas
FLUOXETINA	cápsulas	20 mg envase con 28 cápsulas
FLUOXETINA	cápsulas	20 mg caja con 14 cápsulas en blister

Fuente: S.S.A. Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para farmacias y público en general al 3 de agosto de 2007.

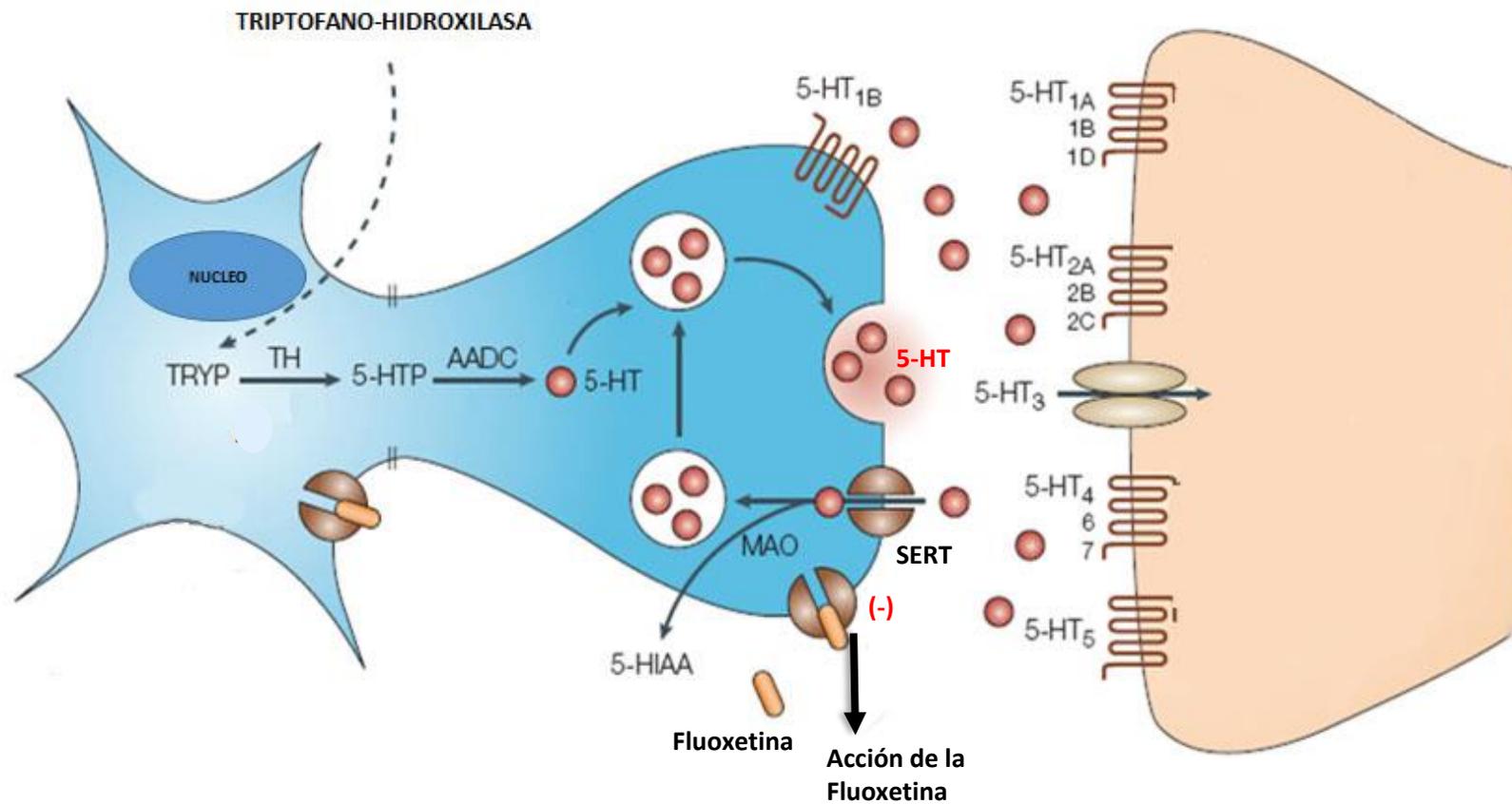


Figura 8.- síntesis de la serotonina en la neurona serotoninérgica y acción de la Fluoxetina como inhibidor de la recaptura de serotonina Modificado de (Wong, *et al.*, 2005).

Se sugiere que los SSRI, como la fluoxetina tienen efectos adversos cuando se consumen durante el embarazo, debido a que afecta principalmente al producto e inducen malformaciones congénitas (Wogelius *et al.*, 2006), bajo peso al nacer (Wen *et al.*, 2006) y problemas de hipertensión pulmonar que persiste después del nacimiento (Chambers *et al.*, 2006). También es un factor de riesgo de aborto debido a que produce daño en el embrión o feto (Hemels *et al.*, 2005).

Entre los efectos de la fluoxetina en la reproducción, se ha mostrado que cuando en la rata preñada se le administra este SSRI y su administración continua hasta los 21 días del desarrollo postnatal, en las crías hembras induce alteraciones en el ciclo estral e incrementa el número de folículos y la atresia de estos. Con base en esto los autores proponen que la fluoxetina afecta la vida reproductiva en la etapa adulta. Sin embargo, en la actualidad no se conocen todos los efectos de este fármaco en el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Moore *et al.*, 2015).

## **JUSTIFICACIÓN**

La serotonina se encuentra en los tres componentes del eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-ovario, en donde modula la secreción de las gonadotropinas y las funciones del ovario. Aunado a esto, existen un conjunto de fármacos, los SSRI, como la fluoxetina que modifican al sistema serotoninérgico y que son utilizados en el tratamiento del déficit de atención, el trastorno obsesivo-compulsivo así como en la depresión mayor entre otros. También la FDA (Food and Drug Administration), autoriza la prescripción de la fluoxetina en niños, adolescentes y jóvenes que padecen de depresión. Sin embargo, se desconoce si estas sustancias actúan directamente en el eje reproductivo femenino, modulando su funcionamiento. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de fluoxetina en la concentración de serotonina en el hipotálamo-hipófisis-ovario, en el inicio de la pubertad, primera ovulación, concentración de gonadotropinas y hormonas esteroides en el suero de la rata hembra prepúber.

## **HIPÓTESIS**

La serotonina modula el eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-ovario y en las funciones del ovario, esteroidogénesis y ovulación. Por ello, el incremento en la concentración de serotonina en los componentes de este eje, inducido por la administración del inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina, fluoxetina, disminuirá la secreción de gonadotropinas, estradiol y la primera ovulación en la rata prepúber

## **OBJETIVO GENERAL**

Analizar los efectos de la inhibición de la recaptura de serotonina inducido por la administración de fluoxetina en el inicio de la pubertad, primera ovulación, secreción de gonadotropinas y hormonas esteroides en la rata hembra prepúber.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

- Estudiar los efectos de la administración de fluoxetina en la rata hembra prepúber en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo anterior y medio, el Rafe dorsal y medial, la hipófisis y el ovario.
- Estudiar los efectos de la administración de fluoxetina por 4 y 7 días consecutivos en la rata hembra prepúber en el inicio de la pubertad, apertura y primer estro vaginal.
- Analizar los efectos de la administración de fluoxetina en la rata prepúber en la primera ovulación.
- Analizar los efectos de la administración de fluoxetina en la rata hembra prepúber en la concentración sérica de FSH y LH, progesterona y estradiol.
- Analizar el efecto de la administración de fluoxetina en la estructura del ovario de la rata prepúber.

## **MATERIAL Y MÉTODO**

Se utilizaron ratas hembra de 30 días de edad de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de iluminación y oscuridad (14 h luz y 10 h oscuridad) con libre acceso a la madre hasta el momento del destete (21 días) y posteriormente al alimento y agua ad libitum. Los animales se dividieron en diferentes grupos experimentales:

- TA: grupo testigo absoluto, los animales no recibieron ningún tratamiento.
- VH: grupo vehículo, se les administró solución salina al 0.9 % por cuatro o siete días, entre las 09:00 a 10:00 horas.
- FLX 4: A los animales se les administro fluoxetina (Fluoxetine hydrochloride, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) en una dosis de 5 mg/kg de peso corporal por vía intraperitoneal durante cuatro días, entre las 09:00 a 10:00 horas.
- FLX 7: La administración de 5 mg/Kg de fluoxetina (Fluoxetine hydrochloride, Sigma Aldrich St. Louis, MO, USA) se realizó durante siete días entre las 09:00 a 10:00 horas.

Los animales de los cinco grupos experimentales se revisaron diariamente con la finalidad de identificar el día en que se presentó la canalización de la vagina (apertura vaginal), indicador del inicio de la pubertad. A partir del día en que se presentó la apertura vaginal, se inició la toma de frotis vaginales diarios, los que se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-eosina y se observaron al microscopio, todos los animales se autopsiaron en el día del primer estro vaginal, cuando se produce la primera ovulación.

### **Autopsia**

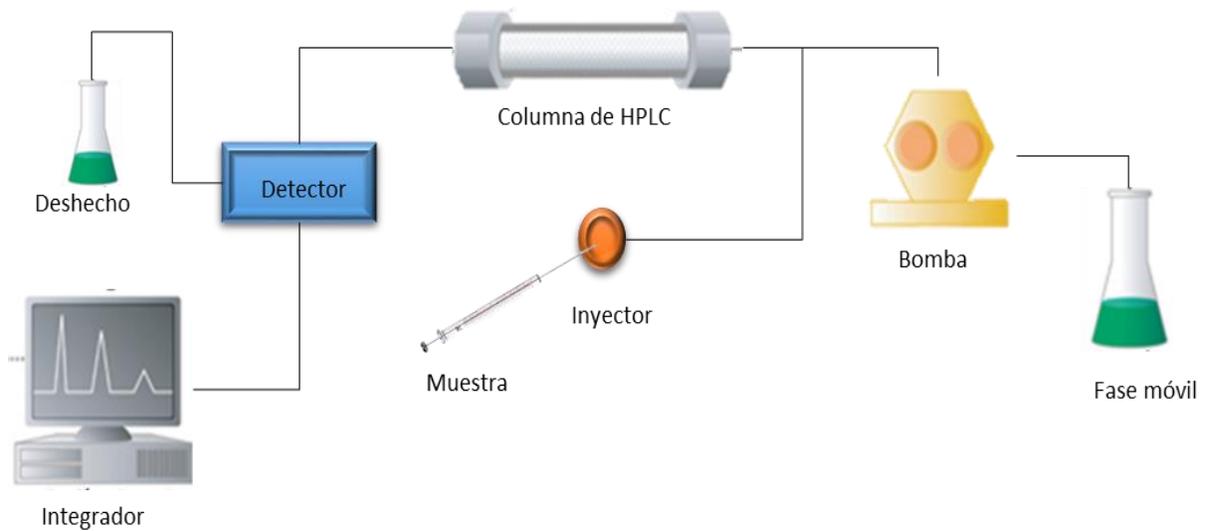
Los animales fueron sacrificados por decapitación, el día del primer estro se realizó la disección del ovario izquierdo, hipófisis e hipotálamo, los que se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de serotonina y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético por cromatografía de líquidos (HPLC). El ovario derecho se fijó en

paraformaldehído se incluyó en parafina y se realizaron cortes histológicos que se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-eosina y posteriormente se analizó la estructura del ovario. Así mismo se extrajeron los oviductos y con ayuda de un estereoscopio se contó el número de ovocitos presentes. En el momento del sacrificio se colectó la sangre del tronco, la cual se dejó coagular durante 15 minutos a temperatura ambiente y posteriormente se centrifugó a 3,500 rpm., durante 15 minutos. Se colectó el suero y se almacenó a -20 °C para la cuantificación de gonadotropinas por radioinmunoanálisis y de hormonas esteroides por la técnica de ELISA.

### **Cuantificación de serotonina y de su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético por cromatografía de líquidos de alta presión.**

Las muestras de hipotálamo anterior y medio y rafe dorsal y medial se diseccionaron siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982). Las muestras se pesaron en una balanza de precisión y se homogeneizaron en ácido perclórico, en 300 µL de ácido para las muestras de hipotálamo y 150 µL para las muestras de rafe y ovario. Posteriormente las muestras de hipotálamo, rafe y ovario se centrifugaron a 12000 rpm., durante 30 min a -4°C, el sobrenadante se filtró usando filtros de celulosa regenerada de poro de 0.45 µm y se inyectó 1mL del filtrado con una jeringa Hamilton al sistema de cromatografía.

El sistema de cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC) (Figura 9), consistió de una bomba isocrática (Modelo L- 250, Perkin Elmer), una válvula de inyección (Reodine modelo 7125 con una capacidad de 20 µl, una precolumna de silica (3.5 cm x 4.6 mm) y una columna C-18 de fase reversa (25cmx4.6mm) acoplada a un detector electroquímico amperométrico LC-4C (Bioanalytical System Inc. USA) acoplado a un inyector Nelson 1020 (Perkin Elmer).

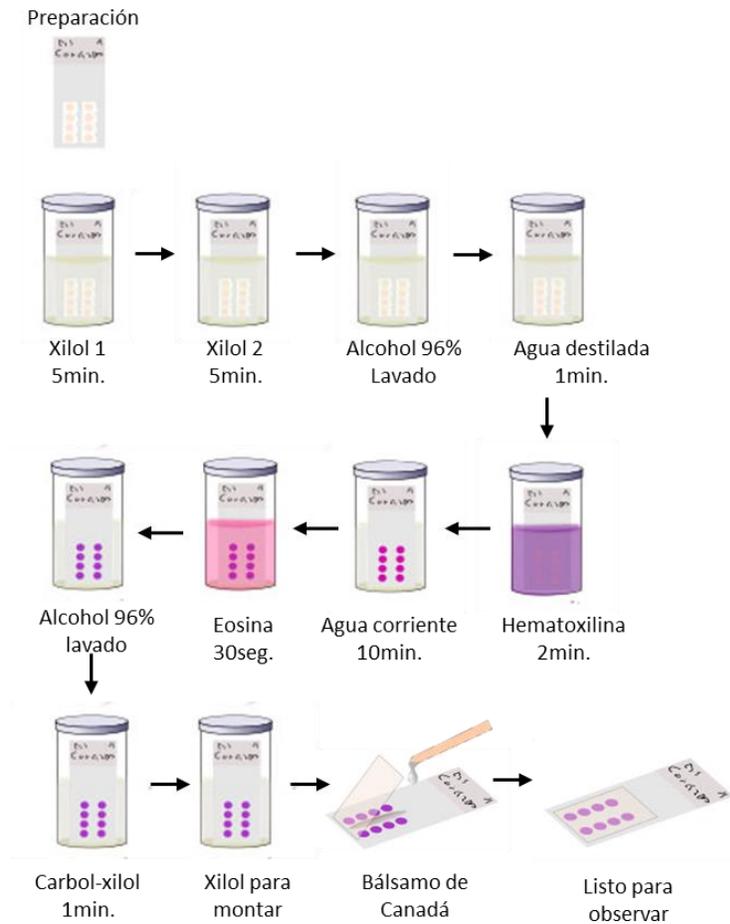


**Figura 9.- Esquema del equipo de cromatografía de líquidos de alta presión**

El equipo identificó a la serotonina y su metabolito por el tiempo de retención y los cuantificó al comparar el área bajo la curva de los picos de la muestra que se obtenía en el proceso, con el área bajo la curva de los estándares.

### **Estructura de ovario**

Uno de los ovarios fue incluido en parafina y con ayuda de un microtomo, se realizaron cortes seriados de 10 micras de grosor, los que se colocaron en portaobjetos con albúmina, con la finalidad de que los cortes se adhirieran al portaobjetos y así no se desprendieran durante el proceso de tinción con la técnica de Hematoxilina-eosina (Figura 10), las preparaciones se dejaron secar en una estufa a 37°C por ocho días para después realizar el análisis de la estructura del ovario, el cual consistió en identificar y contar los folículos preovulatorios y cuerpos lúteos recién formados los cuales están constituidos por dos poblaciones celulares: las células teca luteínicas que proceden de la teca interna, y las células granulosa luteínicas que toman su origen en la capa granulosa del folículo roto, las cuales toman un pigmento lipocromo (amarillento). Con ayuda de un microscopio óptico.



**Figura 10.- Procedimiento de tinción por la técnica hematoxilina-eosina.**

### **Cuantificación de Gonadotropinas**

La LH y FSH fueron evaluadas por radioinmunoanálisis (RIA) usando la técnica del doble anticuerpo, el protocolo y los reactivos utilizados fueron proporcionados por el National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). Los resultados se expresaron como ng/ml.

Se tomaron 100  $\mu$ l de suero para cuantificar LH y FSH, que se colocaron en tubos de vidrio y se les adicionaron 100  $\mu$ l de sus anticuerpos, rLH-RP3 y rFSH-RP2, respectivamente y se incubaron durante 24h a temperatura ambiente.

Posteriormente se agregaron 100 µl del segundo anticuerpo (marcado con yodo=I125) y se incubaron durante 2 horas. Se centrifugaron a -4°C a 3000 r.p.m. por 30 minutos. Se decantó el sobrenadante, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en contador de centelleo Gama para realizar el conteo. Los resultados de la concentración de las hormonas se expresan en ng/ml de suero

La variación del coeficiente intra e interensayo fueron de 5.74 y 7.0% para FSH y de 6.82 y 9.32% para LH, respectivamente.

### **Cuantificación de Hormonas Esteroides**

La concentración sérica de progesterona y estradiol en el suero se realizó por la técnica de ELISA, con un Kit comercial de AccuBind (Monobind Inc. Lake Forest, CA, USA), Se toman 25 mL de suero problema que se colocaron en los pozos correspondientes en las placas de ELISA destinadas para evaluar P4 y E2 .

En la evaluación de P4, se agregaron 50 µl de reactivo enzimático de esta hormona en cada pozo, la placa se agitó, se adicionaron 50 µl de reactivo de biotina de P4, se agitó nuevamente, se cubrió de la luz y se incubó a temperatura ambiente durante 60min. Para la cuantificación de E2 se agregaron 50 µl de reactivo biotinilado de estradiol, la placa se agito, se cubrió e incubo a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregaron 50 µl de reactivo enzimático de estradiol se agito, se protegió de la luz y se incubo a temperatura ambiente durante 90 min.

Concluido el tiempo de incubación de ambas hormonas, se procedió a eliminar el líquido contenido en los pozos de las placas y se procedió a realizar tres lavados con buffer de lavado. Posteriormente se adicionó a cada pozo 100 µl de la solución de substrato y se incubaron a temperatura ambiente durante 20 min. Se adicionaron 50 µl de la solución de paro. Se leyó absorbancia de cada pozo a 450nm. La sensibilidad del ensayo para P4 fue de 0.114 ng/ml y para E2 de 6.04 pg/ml.

## **Análisis Estadístico de los resultados**

Los resultados de las edades de apertura y del primer estro vaginal y el número de ovocitos liberados se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de U de Mann-Whitney. Los porcentajes de las diferentes etapas del ciclo en las que los animales abrieron vagina se analizaron por la prueba de  $\chi^2$ . La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovulan/número total de animales) se analizaron por la prueba exacta de Fisher. Los resultados de concentración de 5-HT, 5-HIAA, FSH, LH, progesterona y estradiol se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple, seguida de la prueba de Tukey. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando la probabilidad (p) sea igual o menor del 0.05.

## **RESULTADOS**

Debido a que en los diferentes parámetros evaluados (concentración de LH, FSH, P4 y E2, ovulación y estructura del ovario), no se observaron cambios significativos entre los animales que se les inyectaron 4 o 7 dosis de solución salina, los resultados de ambos grupos se unieron y se conformó un grupo con VH.

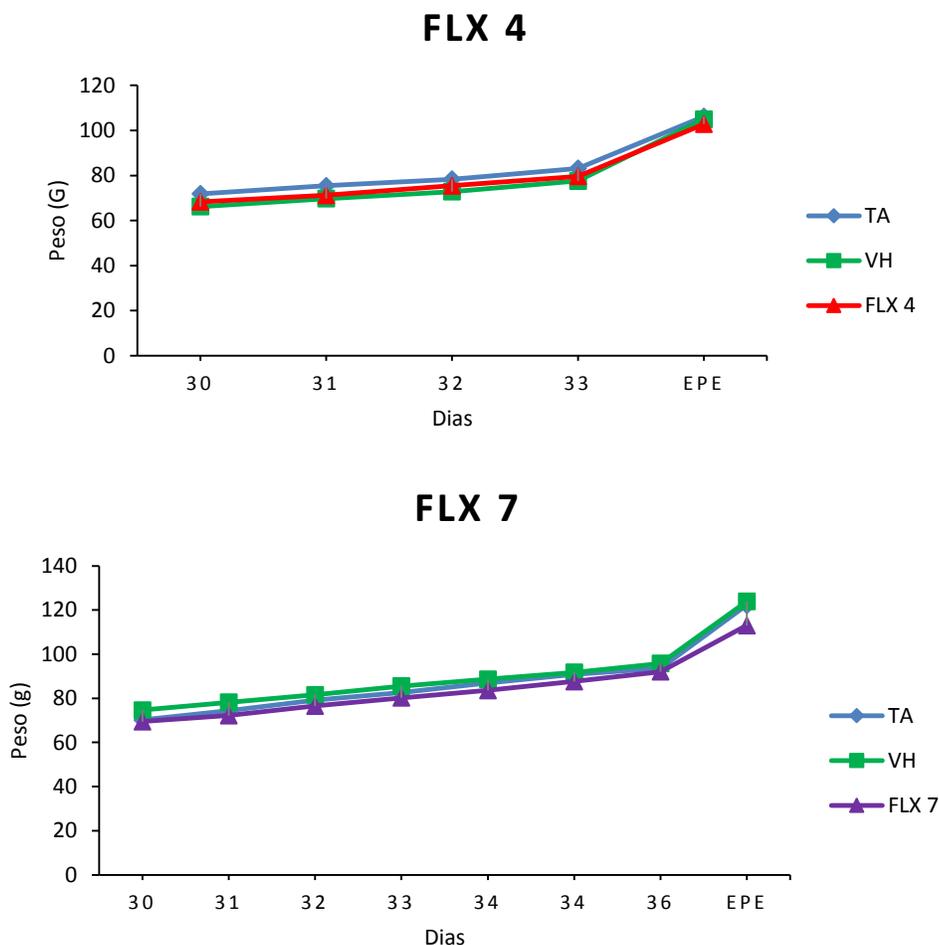
### **Concentración de serotonina y del 5-HIAA.**

La concentración de serotonina y de su metabolito en el hipotálamo anterior, medio, en los núcleos dorsal y medial del rafe, en la hipófisis y en el ovario no se modificó en el grupo con vehiculo en comparación con el testigo absoluto. Este mismo comportamiento se observó en los animales que se les administraron cuatro o siete dosis de fluoxetina (Cuadro 3).

**Cuadro 3.- Concentración (media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo anterior y medio, núcleo del rafe dorsal y medial, hipófisis y ovario de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina 4 dosis (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX4) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

Estructura	Grupo	ng/mg de tejido	
		5-HT	5-HIAA
<b>Hipotálamo Anterior</b>	TA	0.95 $\pm$ 0.11	0.95 $\pm$ 0.09
	VH	1.25 $\pm$ 0.48	0.98 $\pm$ 0.17
	FLX	0.98 $\pm$ 0.16	1.07 $\pm$ 0.09
<b>Hipotálamo Medio</b>	TA	0.79 $\pm$ 0.12	0.76 $\pm$ 0.10
	VH	0.79 $\pm$ 0.11	0.73 $\pm$ 0.15
	FLX	0.90 $\pm$ 0.08	0.70 $\pm$ 0.11
<b>Rafe Dorsal</b>	TA	2.31 $\pm$ 0.43	2.20 $\pm$ 0.41
	VH	3.18 $\pm$ 0.67	2.42 $\pm$ 0.54
	FLX	2.80 $\pm$ 0.42	2.66 $\pm$ 0.36
<b>Rafe Medial</b>	TA	1.39 $\pm$ 0.25	1.97 $\pm$ 0.30
	VH	1.87 $\pm$ 0.78	1.71 $\pm$ 0.45
	FLX	2.14 $\pm$ 0.35	2.03 $\pm$ 0.25
<b>Hipófisis</b>	TA	0.15 $\pm$ 0.02	0.11 $\pm$ 0.01
	VH	0.19 $\pm$ 0.02	0.17 $\pm$ 0.04
	FLX	0.24 $\pm$ 0.03	0.08 $\pm$ 0.01
<b>Ovario</b>	TA	0.23 $\pm$ 0.05	0.28 $\pm$ 0.07
	VH	0.26 $\pm$ 0.05	0.26 $\pm$ 0.09
	FLX	0.23 $\pm$ 0.04	0.30 $\pm$ 0.08

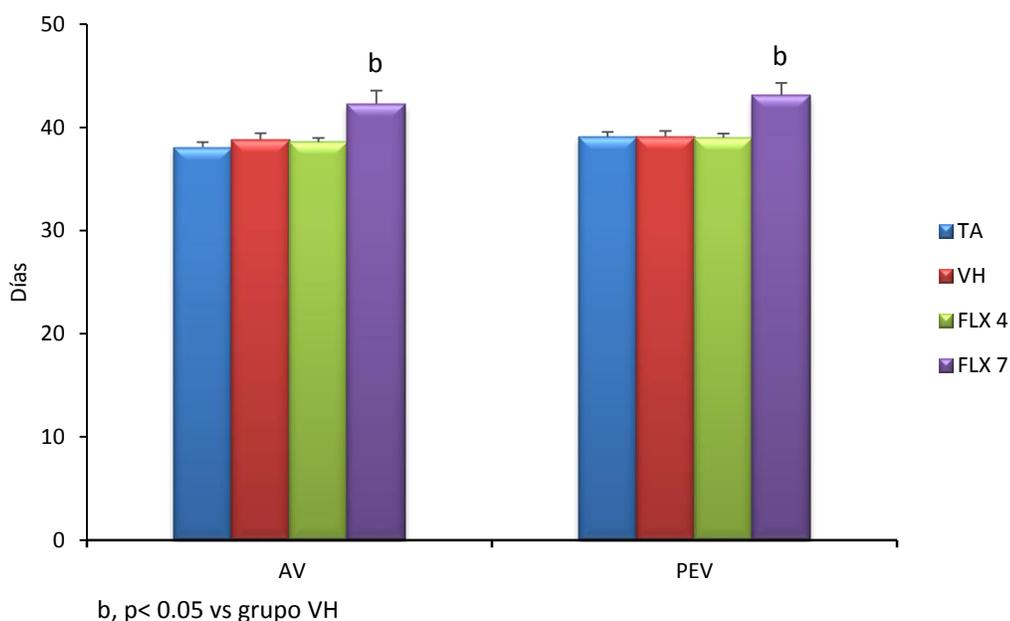
En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, la administración de solución salina no modificó el peso corporal de los animales, este mismo comportamiento se observó en los animales que se les inyectó FLX independientemente de la duración del tratamiento (Figura 11).



**Figura 11.-** Peso corporal (media + e.e.m.) de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con fluoxetina (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX 4) o 36 (FLX 7) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal (PEV).

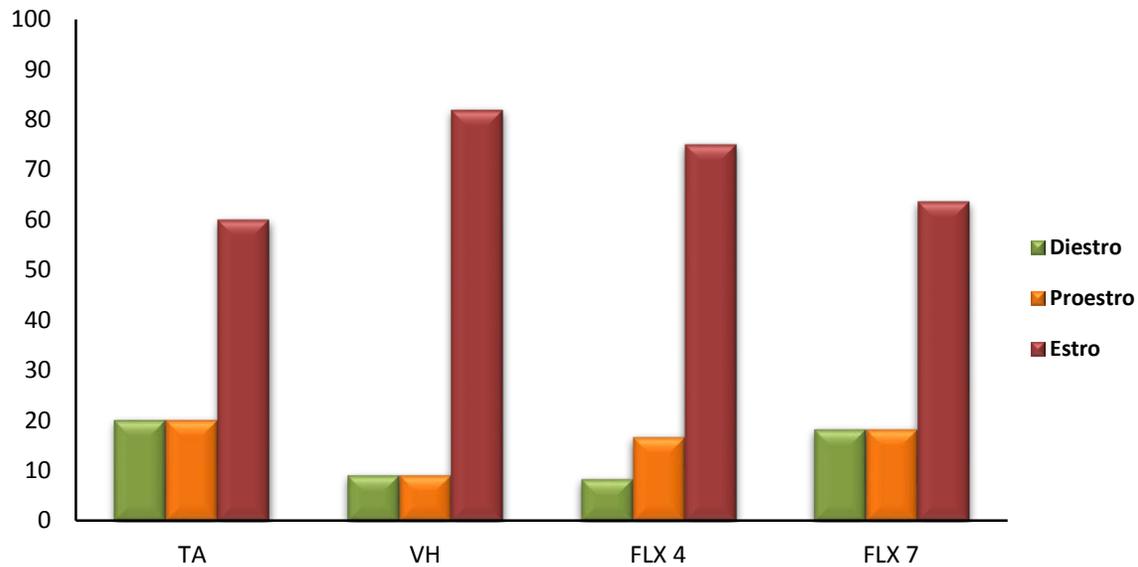
## Pubertad

En comparación con el grupo de animales TA, la administración de VH no modifica las edades de la apertura y del primer estro vaginal (Figura 12), en los animales que recibieron 4 dosis de FLX, se observó un comportamiento similar, mientras que en los animales que recibieron por 7 días la FLX, se observó el retraso significativo en las edades de la apertura y el primer estro vaginal (Figura 12).



**Figura 12.- Edad de apertura y primer estro vaginal (media  $\pm$  e.e.m.) de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con fluoxetina (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX 4) o 36 (FLX 7) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal (PEV).**

Considerando la citología de la vagina en el momento de la apertura vaginal, se observó que en los diferentes grupos experimentales, el frotis caracterizado por la presencia de células sin núcleo en forma de escamas (estro) se presentó en el 60 a 80% de los animales, mientras que del 10 al 20% se observaron leucocitos (diestro) o células con núcleo (proestro) (Figura 13).

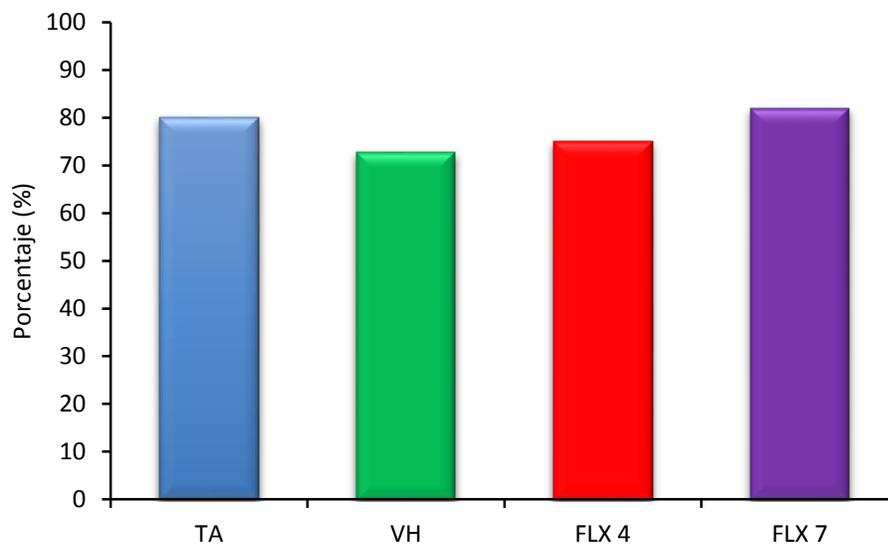


**Figura 13.-** Porcentaje de animales que abrieron vagina en las diferentes etapas del ciclo estral, (diestro, proestro, estro). Grupo testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con fluoxetina (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX 4) o 36 (FLX 7) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

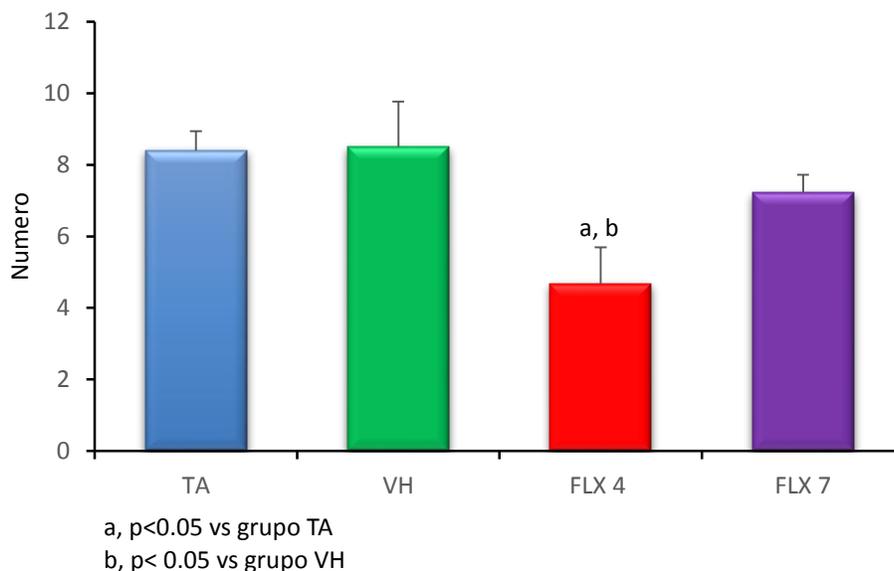
## Ovulación

El porcentaje de animales que ovuló en el día del primer estro no se modificó en los animales que se les administró 4 (FLX 4) o 7 dosis (FLX 7) de fluoxetina en comparación con los animales que se les administró el VH y el grupo TA (Figura 14). Cuando se analizó el número de ovocitos liberados por animal ovulantes se observó que en los animales que recibieron VH o 7 dosis de fluoxetina (FLX 7) no se presentaron cambios, mientras los que recibieron 4 dosis disminuyeron significativamente (Figura 15).

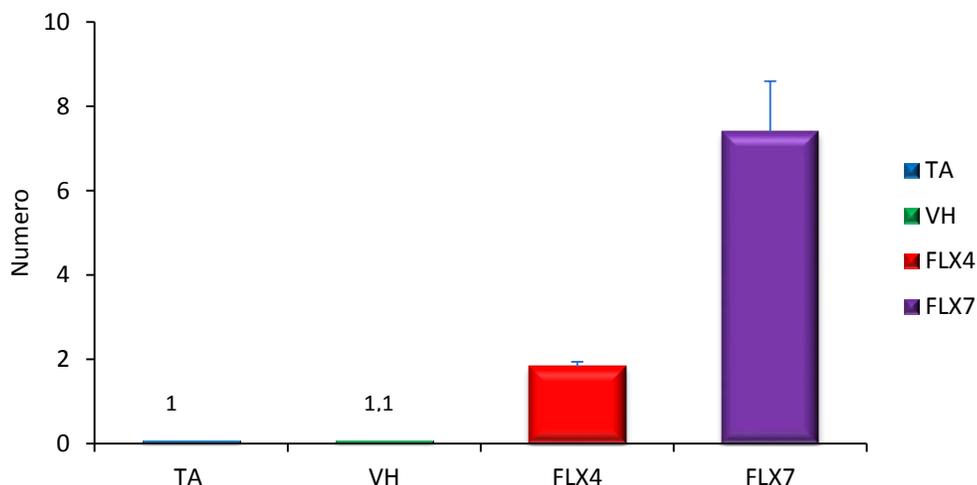
Cuando se analizó la estructura del ovario de los animales testigo absoluto o tratados con VH se identificaron cuerpos lúteos recién formados y ausencia de folículos preovulatorios en la mayoría de los animales, con excepción de un animal TA y en dos con VH, en los cuales se identificó un folículo preovulatorio con características de atresia, mientras que en los tratados con FLX7 se observó el aumento de este tipo de folículos (Figura 16).



**Figura 14.-** Porcentaje de animales ovulantes (número de animales ovulantes/número de animales) de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con fluoxetina (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX 4) o 36 (FLX 7) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal (PEV).



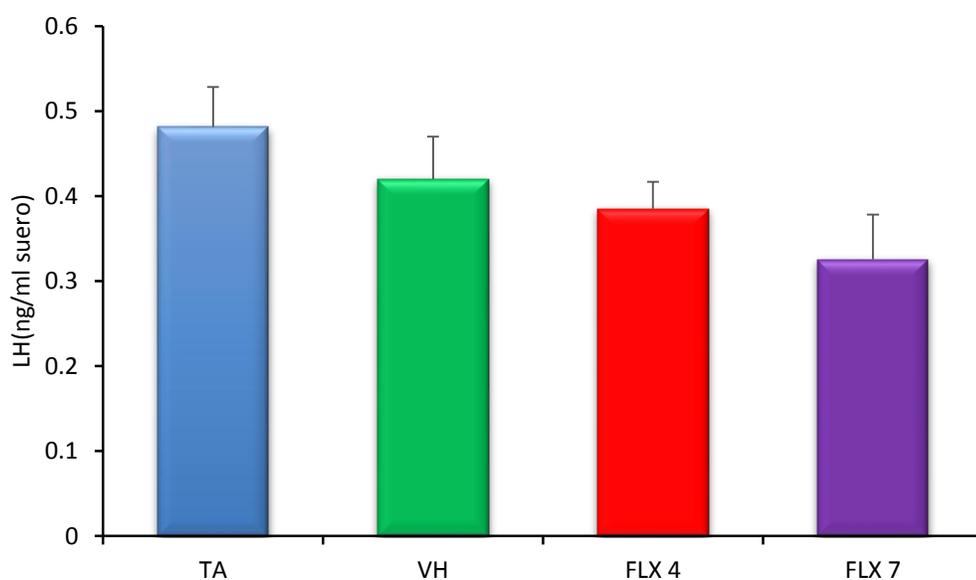
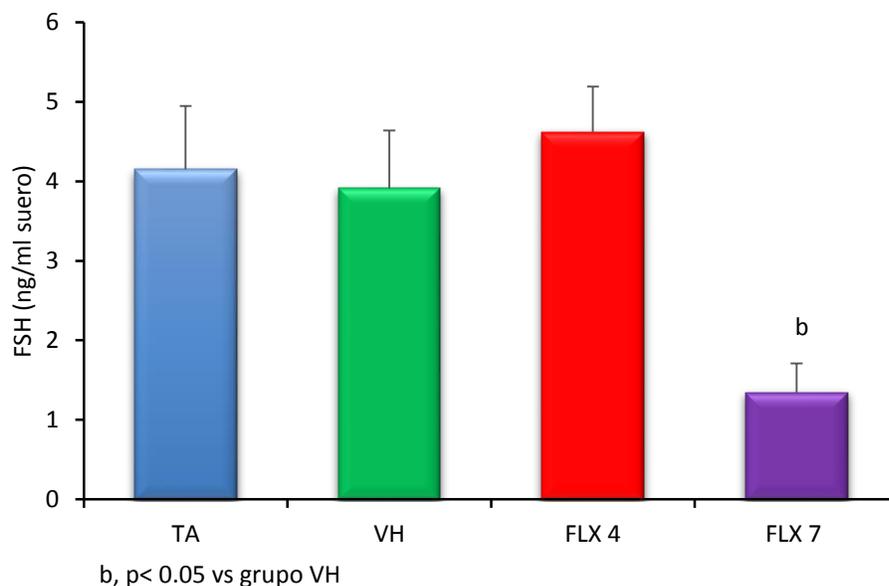
**Figura 15.-** Número de ovocitos liberados (media  $\pm$  e.e.m.) en ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con fluoxetina (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX 4) o 36 (FLX 7) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal (PEV). Foliculos preovulatorios atrésicos (FPA).



**Figura 16.- número de folículos preovulatorios atrésicos (media  $\pm$  e.e.m.) en ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con fluoxetina (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX 4) o 36 (FLX 7) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal (PEV).**

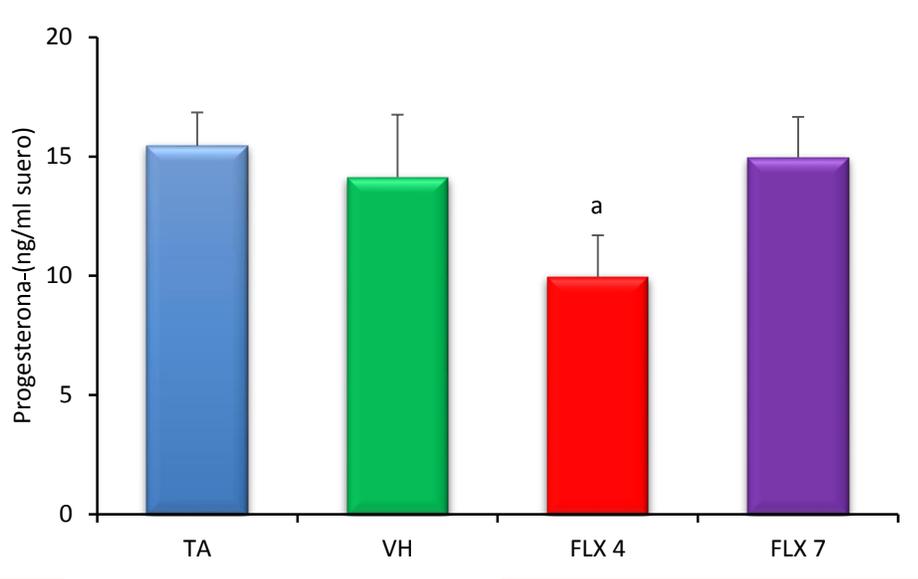
### **Concentración de gonadotropinas**

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto y los que se les administró el VH, los que recibieron 4 dosis (FLX 4) no mostraron cambios en cuanto a las concentraciones de FSH. Mientras que en los animales que recibieron 7 dosis (FLX 7) la concentración de la hormona disminuyó. La concentración de LH en el suero de los animales de los diferentes grupos experimentales no se modificó (Figura 17).

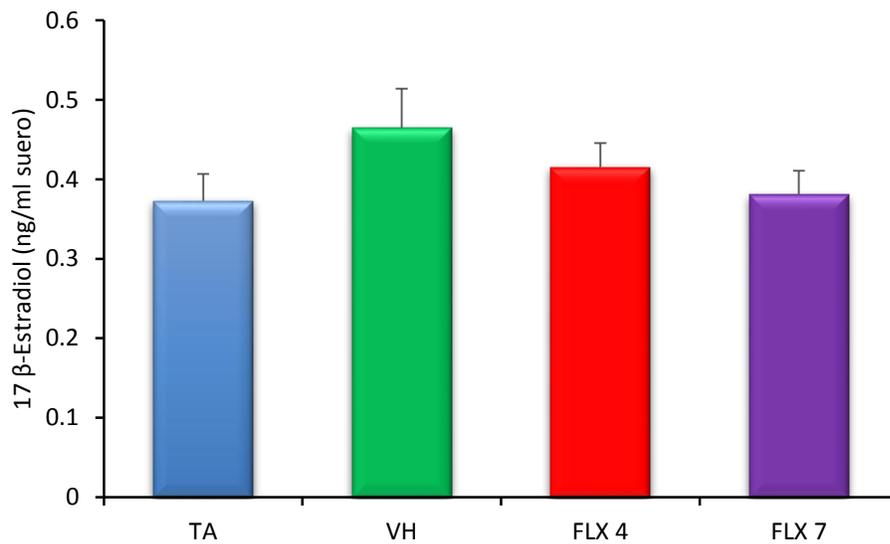


**Figura 17. Concentración de la hormona folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) (media  $\pm$  e.e.m.) en ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con fluoxetina (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX 4) o 36 (FLX 7) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

En los animales que se les administró el VH, no se modificó la concentración de progesterona en relación con el grupo testigo absoluto. El mismo comportamiento se observó en los animales que se les inyectó FLX 7, esta hormona disminuyó en los animales que recibieron FLX 4. La concentración de estradiol en suero de los animales no se modificó (Fig. 18).



a,  $p < 0.05$  vs grupo TA



**Figura 18.-Concentración de estradiol y progesterona (media  $\pm$  e.e.m.) en ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH), o con fluoxetina (FLX) a partir del día 30 hasta el 33 (FLX 4) o 36 (FLX 7) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

## Estructura del ovario

En el ovario de los animales testigo absoluto, tratados con VH o con FLX se observaron folículos en las diferentes etapas de desarrollo. Los folículos preantrales se caracterizaron por un ovocito con un núcleo grande, y las células de la granulosa formando diferentes capas organizadas en forma concéntrica. En algunos de estos folículos se observan cavidades entre las células de la granulosa, inicio de la formación del antro. Rodeando a estas se identifica una vaina de tejido conectivo, la teca folicular. En todos los animales se observaron cuerpos lúteos recién formados (figura 19).

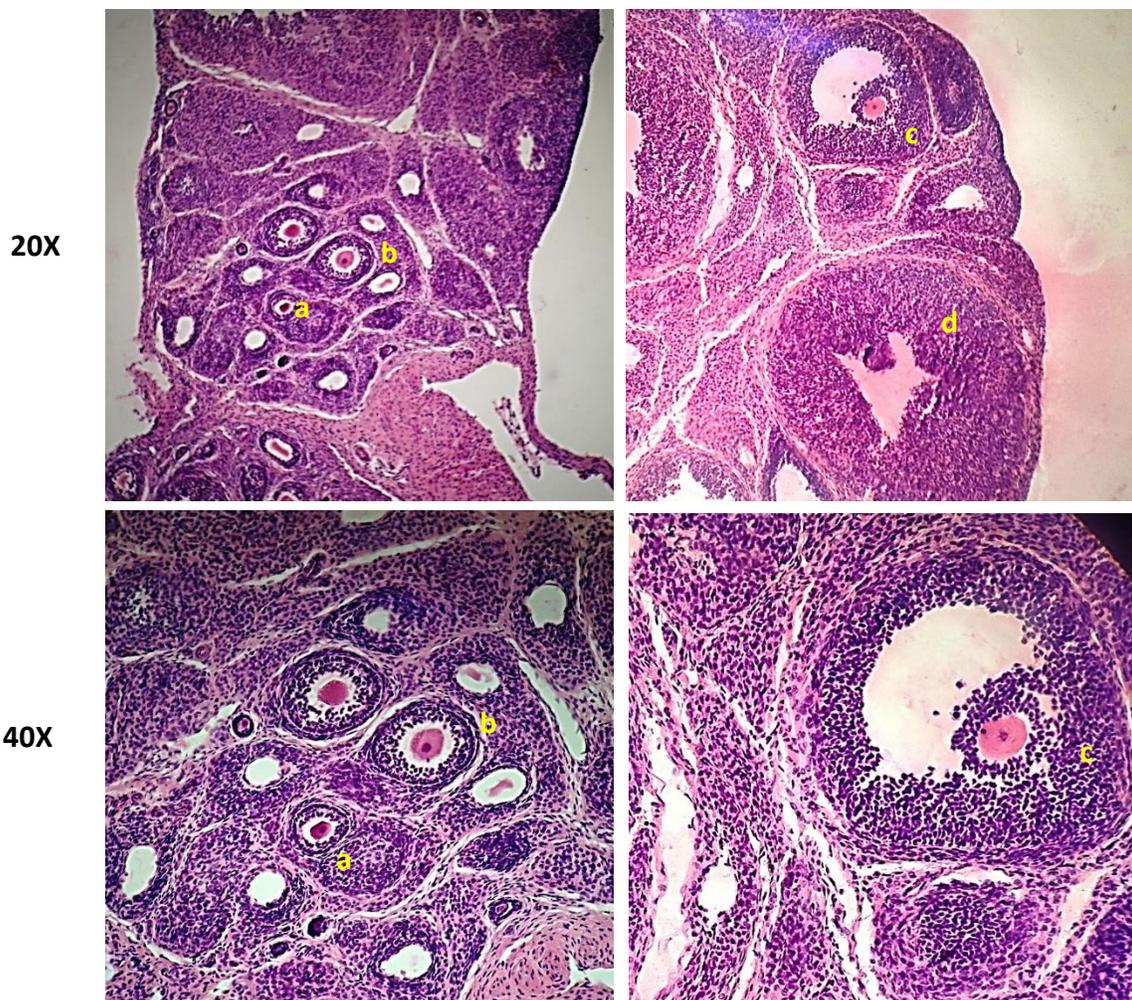
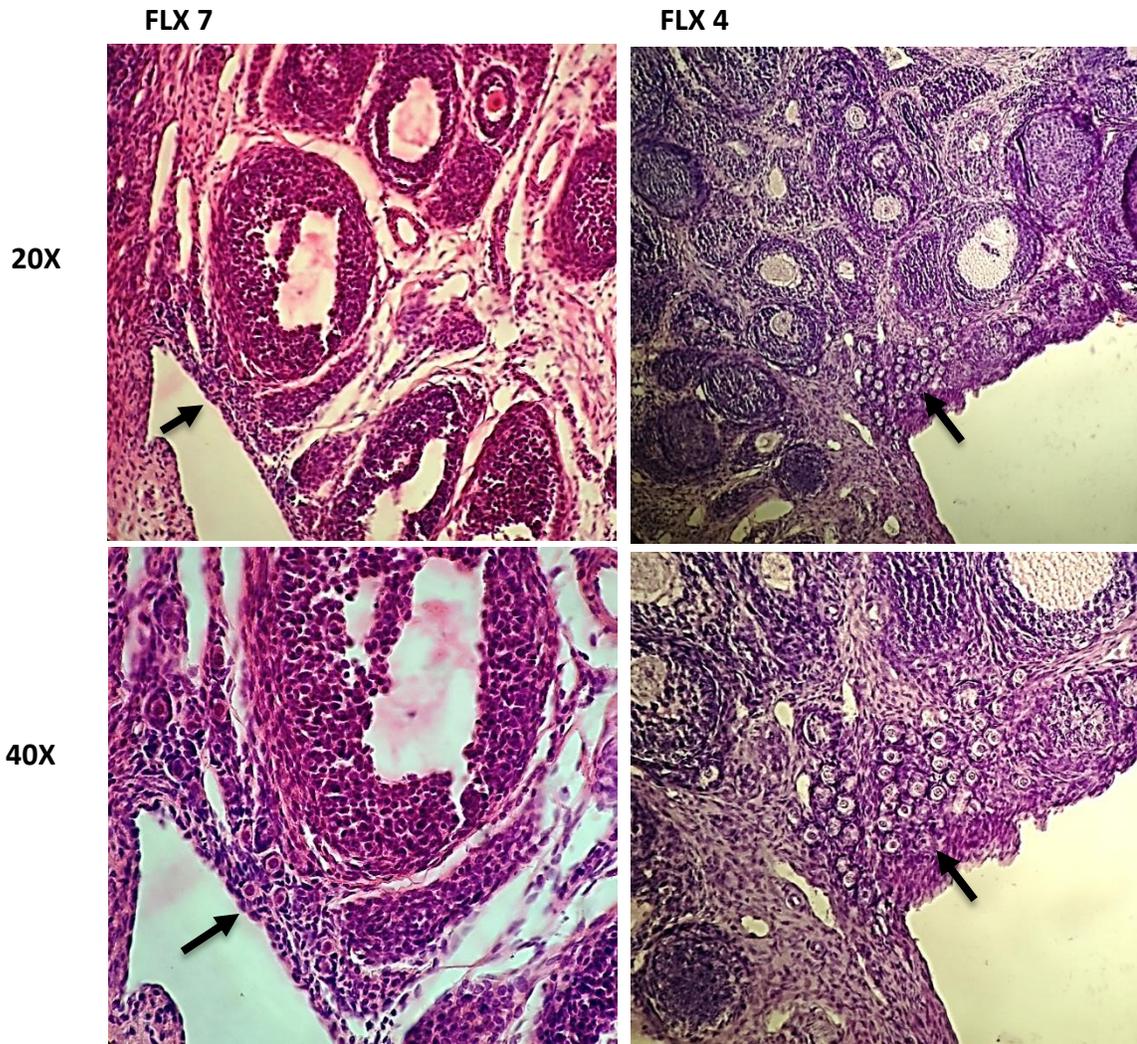


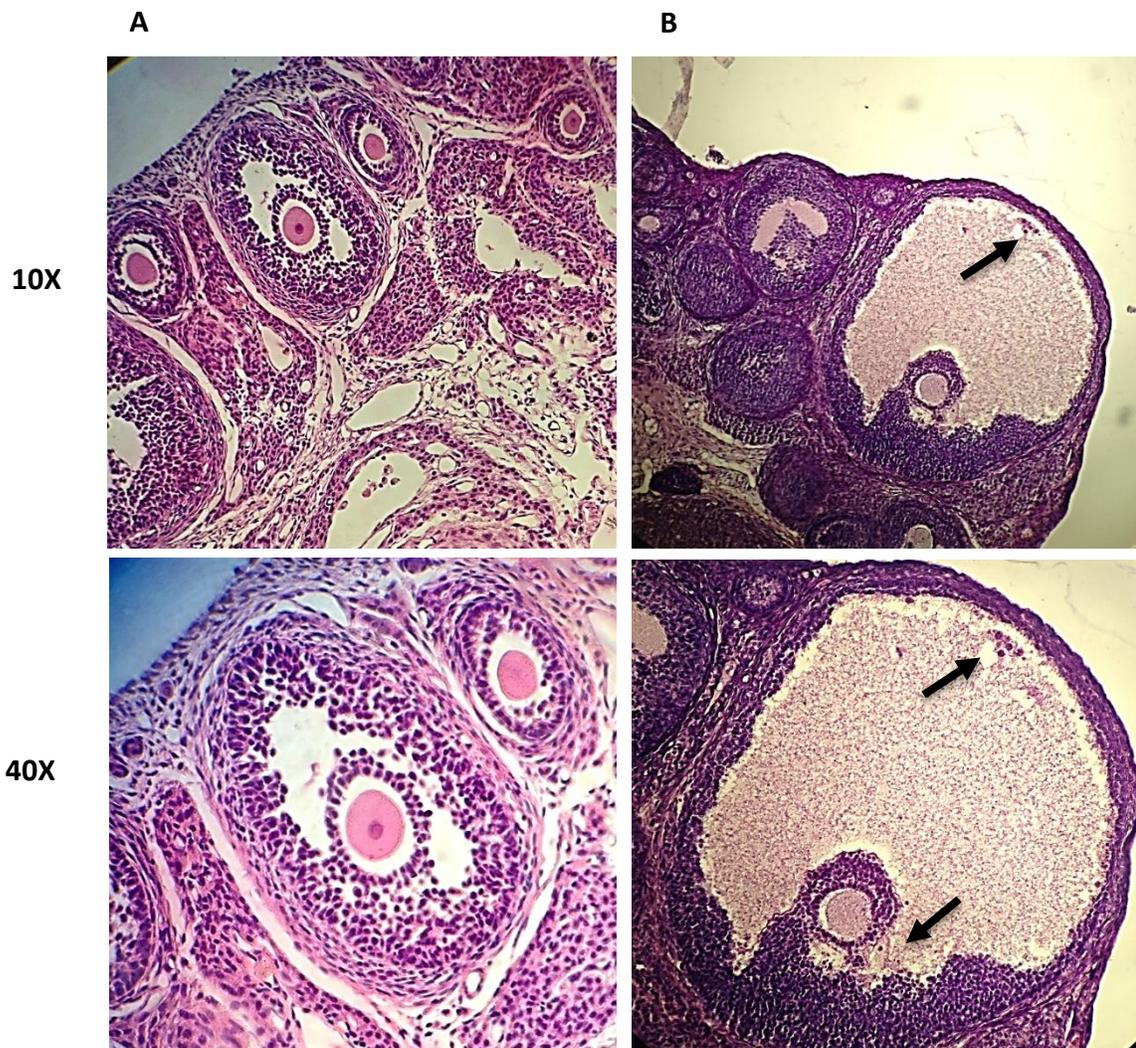
Figura 19.- Fotomicrografía de cortes de ovario de animales testigo absoluto, donde se muestran folículos primarios y en crecimiento: folículo primario (a), y en crecimiento preantrales (b); Folículo en crecimiento antral (c) y cuerpo lúteo recién formado (d).

Los folículos primordiales se caracterizaron por estar conformados de un ovocito con un núcleo grande, rodeado de células de la granulosa aplanadas. Los folículos primordiales se ubicaron cerca del epitelio germinal, en los animales que se les administraron siete dosis de fluoxetina se observó el incremento en el número de este tipo de folículos (Figura 20).



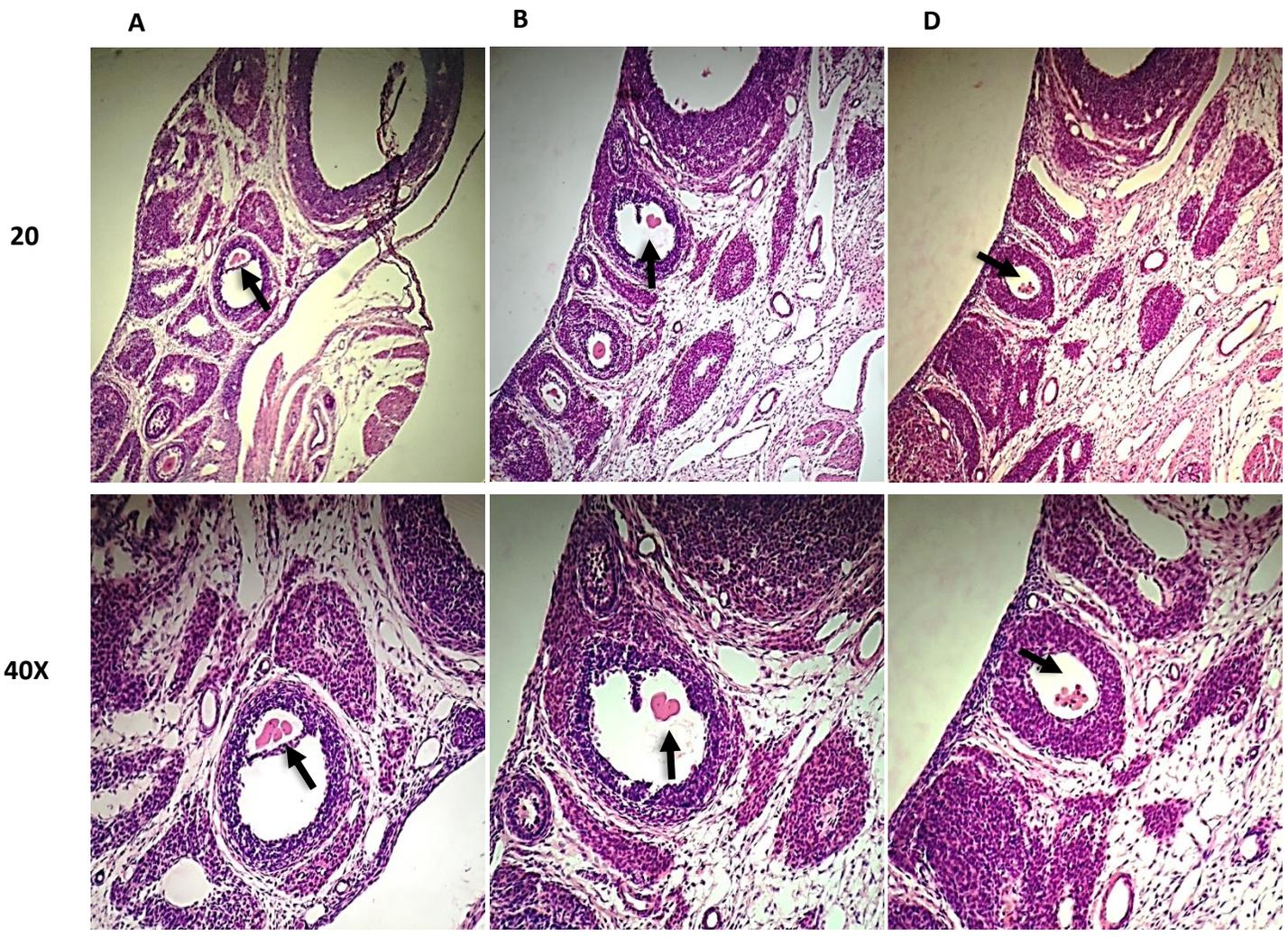
**Figura 20.-** Fotomicrografía de cortes de ovario donde se muestran folículos primordiales: en el ovario de animales que se les administraron cuatro dosis de fluoxetina (FLX4) y en el ovario de los animales que se les administraron siete dosis de fluoxetina. La flecha indica la ubicación de los folículos primordiales.

Las características de atresia folicular que se identificaron en los ovarios de los animales testigo absoluto, VH, FLX4 y FLX 7 comprendieron, engrosamiento de la teca, descamación de las células de la granulosa en el antro del folículo (Figura 21). Mientras que en los animales que se les administraron FLX7, además de las características de atresia antes mencionadas, se observó la presencia de más de un ovocito o fragmentación del ovocito en los folículos en diferentes etapas del desarrollo (Figura 22).



**Figura 21.-** Fotomicrografía de cortes de ovario donde se muestran folículos preantrales sanos VH (A) y folículos preovulatorios atréticos FLX4 (B). Las características de atresia que se observan y que se señalan con una flecha incluyen descamación de las células de la granulosa en el antro del folículo, y desprendimiento del cumulus oophorus.

En los animales testigo absoluto y tratados con VH rodeando a los folículos en las diferentes etapas del desarrollo se observa el tejido intersticial con una organización normal. Mientras que en el ovario de algunos animales que se trataron con cuatro o siete dosis de fluoxetina se observó la pérdida de células en el tejido intersticial y la presencia de tejido fibroso en el intersticio (Figuras 21 y 22).



**Figura 22.-** Fotomicrografía de cortes de ovario de ratas tratadas con siete dosis de fluoxetina (FLX7), en donde se observan los folículos con fragmentación del ovocito y pérdida del tejido intersticial (flecha).

## DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que la administración de fluoxetina modifica el inicio de la pubertad, la primera ovulación y la estructura del ovario. El hecho de que en estos animales se retrasaran las edades de la apertura y primer estro vaginal, así como la disminución en el número de ovocitos liberados y la fragmentación del ovocito en los folículos apoya esta interpretación.

La fluoxetina, al unirse a la SERT inhibe la recaptura de serotonina en las terminales presinápticas, por lo que incrementa la concentración extracelular de serotonina (Borg y Brodin, 1996). Sin embargo, en nuestro estudio no se observó tal efecto debido a que no se modificó la concentración de serotonina y su metabolito en el hipotálamo, rafe, la hipófisis u ovario. Estos resultados coinciden con lo observado por otros autores en diferentes regiones del cerebro (Ko *et al.*, 2014). La falta de cambios en la concentración de serotonina y su metabolito en los animales tratados con FLX posiblemente se relacionen con el tiempo que transcurrió de la última administración hasta el primer estro vaginal, que fue el día del sacrificio, cinco días en los animales que recibieron 4 dosis del fármaco y seis en los que se realizaron 7 administraciones. Lo anterior se sustenta en las evidencias que muestran que la administración 3 mg/Kg de fluoxetina, esta se elimina de la circulación entre las 9 horas posteriores a su administración, debido a que se metaboliza a norfluoxetina cuya concentración aumenta a partir de las 0.5 h y se mantiene hasta por 24 horas e induce el incremento de la concentración de serotonina en el cerebro, efecto que se mantiene hasta por 18 horas, para después disminuir (Qu *et al.*, 2009).

Otra posibilidad es que a corto plazo se incrementara la síntesis de serotonina y posteriormente disminuyó. En relación a esto se ha mostrado que después del aumento en la concentración de serotonina inducida por la administración de FLX, se produce un efecto de retroalimentación negativo en la actividad de la enzima triptofano hidroxilasa, limitante en la síntesis de serotonina (Maciag *et al.*, 2006). Aunado a esto,

cuando a ratas se les administra 5 mg/kg de Fluoxetina diariamente durante 7 días, disminuye el número de células positivas a triptofano hidroxilasa en los núcleos NDR y NMR (MacGillivray *et al.*, 2010), regiones que son una de las fuentes de serotonina del hipotálamo y de la hipófisis (George y Siegel, 1999).

En nuestro modelo de estudio la dosis administrada de 5 mg/kg de fluoxetina, es la mínima necesaria que modifica al sistema serotoninérgico y que no genera trastornos en la alimentación, como sucede con dosis de 10, 20 o 60 mg/kg de peso corporal (Bolaños y Cabrera, 2008). Aunado a esto en los animales que se les administraron FLX 4 o FLX 7 no se modificó el peso corporal de los animales, lo que coincide con lo reportado para la dosis de 5 mg/kg de fluoxetina (Oliveira *et al.*, 2013) y para otros inhibidores de la recaptura de serotonina como el citaloplam (Deiró *et al.*, 2004). Por ello las alteraciones que se observaron al inicio de la pubertad y en la primera ovulación no se pueden atribuir a trastornos de la alimentación, factor que es importante y puede incluso modificar el inicio de la maduración sexual de la rata (Fungfuang *et al.*, 2013).

El retraso en edad de apertura vaginal que se observó en los animales que se les administró FLX 7, no puede ser explicado por una menor secreción de estradiol, debido a que la concentración del esteroide no se modificó. Sin embargo es posible que en estos animales se retrasaran los eventos que conducen a la secreción de estrógenos para inducir la canalización de la vagina. En relación a esto se ha mostrado que el inicio de la pubertad en la rata y en otras especies es el resultado de que en el hipotálamo aumentan los pulsos en la secreción de la GnRH, que estimulan a los gonadotropos donde se lleva a cabo una mayor producción de gonadotropinas, pico preovulatorio, lo que induce la maduración final del folículo y una mayor secreción de estrógenos (Ojeda y Skinner, 2006). Por lo que es posible que en estos animales FLX 7 se retrasaran los eventos antes mencionados, lo que se reflejó en el retraso en el inicio de la pubertad.

La posibilidad de que el retraso en la edad de la apertura vaginal es explicado por el retraso temporal del incremento en la producción de estradiol, se apoya en las evidencias que muestran que la apertura vaginal es un evento dosis dependiente, debido a que la administración de estradiol adelanta este proceso (Piacsek y Streur, 1975) y la remoción de los ovarios la retrasa (Gitlin, 1974). Aunado a esto, se ha mostrado que en la vagina se expresan los receptores a estrógenos ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Couse *et al.*, 1997); que en los días cercanos a la pubertad, esta hormona favorece que la capa compacta de células del canal vaginal se disgregue resultando en la apertura de la vagina (Ojeda *et al.*, 1980), como resultado de la muerte celular programada de células epiteliales específicas de la membrana que cubre la vagina (Gray Jr. y Ostby, 1995).

Por el momento no tenemos una explicación al hecho de que en los animales que recibieron FLX4 no se modificara el inicio de la pubertad, mientras que en los que se les administraron 7 dosis si se afectó este aspecto. Sin embargo, es posible que la administración de 4 dosis de fluoxetina no fue suficiente para retrasar el incremento en la secreción de estrógenos que precede la apertura vaginal.

En los animales que se les administraron cuatro dosis del fármaco el número de ovocitos liberados disminuyó significativamente, no se explica por una menor secreción de gonadotropinas, debido a que en estos animales no se modificó la concentración de FSH y LH. Sin embargo, no se puede descartar que en los días previos al inicio de la pubertad en estos animales se modificará la secreción preovulatoria de las gonadotropinas y como consecuencia disminuiría el crecimiento y la maduración folicular y por ende la ovulación, ya que se ha mostrado este incremento en la secreción de FSH y LH es esencial para el crecimiento y maduración final del folículo (Quirk *et al.*, 2004).

En nuestro estudio la fluoxetina se administró por vía sistémica y por lo tanto actuó en los tres componentes del eje reproductivo. Por lo que es difícil pensar que la disminución en la ovulación se explique exclusivamente por la modificación en la

secreción de las gonadotropinas. Otra posibilidad es que la fluoxetina modificara el sistema serotoninérgico del ovario y como consecuencia la ovulación. Esta idea se sustenta en las evidencias que muestran que en el complejo cumulus-ovocito se expresa la SERT (Dubé y Amireaul, 2007; Moore *et al.*, 2015). Cuando a la hembra prepúber se le administra serotonina por vía sistémica disminuye el número de ovocitos liberados en el día del primer estro vaginal y aumenta el número de folículos preovulatorios atrésicos (Moran *et al.*, 2012). La administración de serotonina en la bursa del ovario, disminuye la producción de estradiol, hormona que es esencial en el mantenimiento del desarrollo del folículo (Moran *et al.*, 2012). Conjuntamente nuestros resultados y lo reportado en bibliografía no permiten proponer que, a pesar de que la concentración de 5-HT en el ovario en el día del sacrificio no se modificó, no se puede descartar que durante el tiempo que se administró el fármaco se modificara la concentración de serotonina en la gónada y con ello el desarrollo folicular, que culmina con la ovulación.

A diferencia de lo observado en los animales tratados con 4 dosis de FLX, en los que se les inyectaron 7 dosis, no se modificó el número de ovocitos liberados. Sin embargo, en estos animales se observó el incremento en el número de folículos preovulatorios con características de atresia ( $7.4 \pm 1.2$ ), del aumento en la población de folículos primordiales y primarios, lo que se acompañó de la disminución en la concentración sérica de FSH. Estos resultados nos permiten proponer que el tratamiento con fluoxetina por un lapso de tiempo mayor, favoreció el desarrollo de un mayor número de los folículos, por lo que un mayor número alcanzó la etapa de preovulatorio, pero por la modificación en la secreción de las gonadotropinas en los días previos en el día del primer estro vaginal, la maduración final de los folículos no continuo y no concluyó con ovulación. A diferencia de los que se observa en el desarrollo de los folículos primordiales y primarios, cuyo desarrollo es independiente de las gonadotropinas, el desarrollo de los folículos antrales y preovulatorios es dependiente de la FSH (Quirk *et al.*, 2004).

Moore y colaboradores (2015), mostraron que en la progenie de ratas hembras tratadas con fluoxetina durante la preñez, aumenta el número de folículos primarios, (ovocito con una o dos capas de células de la granulosa cúbicas) y secundarios (con varias capas de granulosa y antro). Además se ha mostrado que el tratamiento de la rata con fluoxetina por una semana induce la proliferación de las neuronas del girus dentado (Lee *et al.*, 2001) y de las células madre embrionarias de humano precursoras de las neuronas (Chang *et al.*, 2010).

El efecto de la fluoxetina en la proliferación celular posiblemente es mediado por el incremento en la concentración de serotonina, a la que se le atribuye un efecto mitogénico (Fanburg y Lee 1997), de diferenciación celular efecto que depende del subtipo de receptor al que se une la amina (Azmitia, 2001).

El mecanismo por el cual en los animales tratados con fluoxetina se modifica el desarrollo del folículo y la primera ovulación, es desconocido hasta el momento. Sin embargo, es posible que al modificar el sistema serotoninérgico del ovario, se alteró una vía de señalización intraovárica, que estimulan que un mayor número de folículos que inician su crecimiento y que en etapas avanzadas de su desarrollo modifican la respuesta a las gonadotropinas o se modificó la secreción preovulatoria de las gonadotropinas. En apoyo a esto, en el pez Zebra expuesto a Fluoxetina disminuye el número de huevos liberados, acompañado de la disminución de la expresión de los genes del receptor para FSH y LH (Lister *et al.*, 2009). En la rata estimulada con gonadotropina de suero de yegua preñada (PMS) y 5-HT se ha observado la disminución en el número de ovocitos liberados (O'steen, 1964). Tales evidencias sustentan la idea de que la serotonina modifica la respuesta del ovario a la acción de las gonadotropinas.

En la rata la LH y la prolactina son esenciales en el proceso de luteinización de las células foliculares, teca y granulosa, después de la ovulación para formar el cuerpo lúteo, estructura transitoria del ovario que sintetiza progesterona bajo la acción de estas hormonas (Niswender y Nett, 1994). La menor concentración sérica de

progesterona observada en los animales tratados con FLX4 no se acompañó de modificaciones en la concentración de LH, por lo que es posible que la menor producción de progesterona observada en estos animales, es el reflejo de un menor número de cuerpos lúteos que se formaron, debido a que disminuyó el número de folículos que liberaron su ovocito en el día del primer estro vaginal. Después de la ovulación, los cuerpos lúteos son la principal fuente de progesterona ovárica (Tortora y Derrickson, 2006). Además se sugiere que uno de los factores que se asocian con la concentración de progesterona en el suero es la cantidad de tejido esteroideogénico, que a su vez depende del tamaño de las células luteinizadas (Nizwender *et al.*, 2000).

A diferencia de lo observado en los animales tratados con FLX4, en los animales que se les administraron 7 dosis no se modificó la concentración de progesterona, debido a que en este grupo el número de ovocitos liberados fue similar al de los grupos control y como consecuencia en el número de cuerpos lúteos recién formados.

## **CONCLUSIONES**

Con base en los resultados obtenidos se concluye que la fluoxetina:

- Modifica el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la rata hembra preúber.
- En la rata hembra prepuber retrasa el inicio de la pubertad y disminuye la primera ovulación.
- Inhibe la secreción de la hormona estimulante del folículo en la rata hembra prepuber.
- Induce el desarrollo de los folículos en sus primeras etapas y la atresia en los preovulatorios.

## BIBLIOGRAFÍA

AHFS® Consumer Medication Information. © Copyright, (2014). The American Society of Health-System Pharmacists, Inc., 7272 Wisconsin Avenue, Bethesda, Maryland. Documento revisado - 15/04/2012.

Azmitia E. C. (2001). Modern views on an ancient chemical: Serotonin effects on cell proliferation, maturation and apoptosis. *Brain Research Bulletin*. 56, 413-424.

Baker T. G. (1982). Oogenesis and ovulation. En: *Germ cells and fertilization* (C. R. Austin and R. V. Short, Eds.). Cambridge University Press, Cambridge. pp. 17 – 45.

Baldessarini R. J, Tarazi F. I. (2001). *Pharmacotherapy of Psychosis and Mania*. En: Hardman JG, Limbird LE, Goodman Gilman A. editores. *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. Vol. I. 10ma. Edición. Editorial Mc Graw-Hill Interamericana.

Barrett K. E., Barman S. M., Boitano S., Brooks H. L. (2010). *Ganong, Fisiología Médica*. 23° edición, Mcgraw-Hill interamericana editores, S.A. de C.V. pp. 273 – 289, 391.

Bethea C. L., Pecins-Thompson M., Schutzer W. E., Gundlah C., Lu Z. N. (1999). Ovarian Steroids and Serotonin Neural Function. *Molecular Neurobiology*. 18(2), 87-123.

Bolaños R. P., Cabrera R. R. (2008). Influencia de los psicofármacos en el peso corporal. *Trastornos de la Conducta Alimentaria*. 8, 813-832.

Borg S., Brodin K. (1996). Antidepressant drugs. En: *Dukes MNG, ed. Meyler's Side Effects of Drugs*. 13th Ed. Amsterdam: Elsevier; 65-69.

Boyer E. W., Shannon M. (2005). The serotonin syndrome. *New England Journal of Medicine*. 352, 1112-1120.

Byskov A. G., Hoyer P. E. (1988). Embryology of mammalian gonads and ducts. En: *The physiology of reproduction* (E. Knobil, J. Neill, Eds.), Raven Press, Ltd, New York. pp. 265-302.

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*. 100, 509-514.

Cadoret R. J., Langbehn D., Caspers K., Troughton E. P., Yucuis R., Sandhu H. K., Philibert R. (2003). Associations of the serotonin transporter promoter polymorphism with aggressivity, attention deficit, and conduct disorder in an adoptee population. *Comprehensive Psychiatry*. 44 (2), 88–101.

Chambers, C. D., Hernandez-Diaz, S., Van Marter, L. J., Werler, M. M., Louik, C., Jones, K. L., Mitchell, A. A., (2006). Selective serotonin-reuptake inhibitors and risk of persistent pulmonary hypertension of the newborn. *New England Journal of Medicine*. 354, 579-587.

Chang E. A., Beyhan Z., Yoo M. S., Siripattarapavat K., Ko T., Lookingland K. J., Madhukar B. V., Cibelli JB. (2010). Increased cellular turnover in response to fluoxetine in neuronal precursors derived from human embryonic stem cells. *International journal of developmental Biology*. 54, 707-715.

Couse J. F., Lindzey J., Grandien K., Gustafson J. A., Korach K. S. (1997). Tissue distribution and quantitative analysis of estrogen receptor  $\alpha$  (ER  $\alpha$ ) and estrogen receptor  $\beta$  (ER  $\beta$ ) messenger ribonucleic acid in the wildtype and ER $\alpha$  knockout mouse. *Endocrinology*, 138, 4613-4621.

De Alba M. J. (1970), Reproducción y genética animal. Edit. SIC. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas de la O.E.A. pp. 58 – 60.

Deiró T. C., Mnjães de C. R., Cabral F., Souza S. L., Freitas S., Ferreira L. M., Guedes R. C., Câmara C. R., Barros K. M. (2004): Neonatal administration of citalopram delays somatic maturation in rats. *Brazilian Journal of Medical Biological Research*. 37, 1503-1509.

Dubé F., Amireault P. (2007). Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sciences*. 81, 1627–1637.

Eyal S., Weizman A., Toren P., Dor Y., Mester R., Rehavi M. (1996). Chronic GnRH agonist administration down-regulates platelet serotonin transporter in women undergoing assisted reproductive treatment. *Psychopharmacology*. 125, 141-145.

Fanburg BL., Lee SL. (1997). A new role for an old molecule: serotonin as a mitogen. *American Journal of Physiology*. 272, 795-806,

Fernandez M. D., Mangel L. T. (1983). Esteroidogenesis. *Hormonas esteroides. Acta medica costarricense*. 26, 144-149.

Findlay J. K., Drummond A. E., Britt K. L., Dyson M., Wreford N. G., Robertson D. M., Groome N. P., Jones M. E. E., Simpson E. R. (2000). The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163, 81–87.

Flórez J., Armijo J., Mediavilla A. (2003). *Farmacología Humana. Fármacos antidepressivos y antimaníacos*. Elsevier Doyma, 4ª Ed: 563-578.

Food and Drug Administration (FDA). (2015) Prozac. Approved Labelin Enclosure.

Frazer A., Hensler JG. (1999). Serotonin. En: Basic neurochemistry. GJ. Siegel, BW. Agranoff, RW. Albers, PB. Molinoff (Edits.). Raven Press, New York, USA. 283-308.

Fungfuang W., Nakao N., Nakada T., Yokosuka M., Saito T. R. (2013). Early Onset of Reproductive Function in Female Rats Treated with a High-Fat Diet. *Journal of Veterinary Medical Science*. 75(4), 523–526.

George J., Siegel. (1999). Understanding the neuroanatomical organization of serotonergic cells in the brain provides insight into the functions of this neurotransmitter. En: Basic Neurochemistry. Bernard W. Agranoff Stephen K. Fisher R. Wayne Albers, Michael D. Uhler. 6ª Edición. Editorial Lippincott Williams and Wilkins. pp. 301-303.

Gitlin G. (1974). Vaginal opening and vaginal epithelium following ovariectomy in newborn rats. *Acta Anatomica*. 90. 117-132.

Golubchik P., Mozes T., Vered Y., Weizman A. (2009). Platelet poor plasma serotonin level in delinquent adolescents diagnosed with conduct disorder. *Progress in Neuro Psychopharmacology & Biological Psychiatry*. 33, 1223–1225.

Gray Jr L. E., Ostby J. S. (1995). In utero 2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin ( TCDD) alters reproductive morphology and function in female rat offspring. *Toxicology and Applied Pharmacology*. 133, 285-294.

Hemels M. E., Einarson A., Koren G., Lanctot K. L., Einarson T. R. (2005). Antidepressant use during pregnancy and the rates of spontaneous abortions: a meta-analysis. *Annals of Pharmacotherapy*. 39 (5), 803–809.

Henriksen R., Dizeyi N., Abrahamsson P. (2012). Expression of Serotonin Receptors 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT2B and 5-HT4 in Ovary and in Ovarian Tumours. *Anticancer Research*. 32, 1361-1366.

Hirshfield A. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*. 124, 43-101.

Hoaki N., Terao T., Wang Y., Goto S., Tsuchiyama K., Iwata N. (2011). Biological aspect of hyperthymic temperament: light, sleep, and serotonin. *Psychopharmacology*. 213, 633-638.

Hoyer D., Martin G. R., (1997). 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*. 36 (4-5), 419-28.

Iceta E. R. (2008). Caracterización del transportador de serotonina humano en células CACO-2: Estudio de los mecanismos de regulación fisiológica. Tesis de Doctorado, Universidad de Zaragoza, España.

Irusta G. (2008). Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: Relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. Tesis de doctorado. Universidad de Buenos Aires Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Departamento de Química Biológica, Buenos Aires, Argentina.

Justo S. N., Rossano G. L., Szwarcfarb B., Rubio M. C., Moguilevsky J. A. (1989). Effect of Serotonergic System on FSH Secretion in Male and Female Rats: Evidence for Stimulatory and Inhibitory Actions. *Neuroendocrinology*. 50, 382-386.

Klug W., Cummings M. (1999). División celular y cromosomas. En: Klug W, Cummings M (eds.). *Conceptos de genética*. Madrid: Prentice Hall. Iberia SRL. pp. 17-32.

Knobil E., Neill JD. (1998). *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press, USA.

Ko M. C., Lee L. J., Li Y., Lee L. J. (2014). Long-term consequences of neonatal fluoxetine exposure in adult rats. *Developmental Neurobiology*. 74, 1038-1051.

Lee H. J., Kim J. W., Yim S. V., Kim M. J., Kim S. A., Kim Y. J., Kim C. J., Chung J. H. (2001). Fluoxetine enhances cell proliferation and prevents apoptosis in dentate gyrus of maternally separated rats. *Molecular Psychiatry*. 6, 725-728.

Li S., Pelletier G. (1995). Involvement of Serotonin in the Regulation of GnRH Gene Expression in the Male Rat Brain. *Neuropeptides*. 29, 21-25.

Linder A. E., Ni W., Diaz J. L., Szasz T., Burnett R., Watts S. W. (2007). Serotonin (5-HT) in veins: Not All in vain. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 343, 415-421.

Lister A., Regan C., Van Zwol J., Van der Kraak G. (2009). Inhibition of egg production in Zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation. *Aquatic Toxicology*. 95, 320-329.

Lu N. Z., Eshleman A. J., Janowsky A., Bethea C. L. (2003). Ovarian steroid regulation of serotonin reuptake transporter (SERT) binding, distribution, and function in female macaques *Molecular Psychiatry*. 8, 353–360.

MacGillivray L., Lagrou L. M., Reynolds K. B., Rosebush P. I., Mazurek M. F. (2010). Role of serotonin transporter inhibition in the regulation of tryptophan hydroxylase in brainstem raphe nuclei. Time course and regional specificity. *Neuroscience*. 171(2), 407-420.

Maciag D., Simpson K. L., Coppinger D., Lu Y., Wang Y., Lin R. C, Paul I. A. (2006). Neonatal antidepressant exposure has lasting effects on behavior and serotonin circuitry. *Neuro-psychopharmacology*. 31, 47–57.

Masui Y. (2000). The elusive cytotstatic factor in the animal egg. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. 1(3), 228-231.

Mayerhofer A., Dissen G. A., Costa M. E., Ojeda S. R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 138, 3320-3329.

Monti J. M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*. 15, 269-281.

Moore C. J., DeLong N. E., Chan K. A., Holloway A. C., Petrik J. J., Sloboda D. M. (2015). Perinatal administration of a selective serotonin reuptake inhibitor induces impairments in reproductive function and follicular dynamics in female rat offspring, *Reproductive Sciences*. 22, 1297-1311.

Moore L. K., Dalley F. A., Agur M. R. A. (2010). *Anatomía con orientación clínica*, 6ta. Edición, Editorial Lippincott Williams & Wilkins. pp. 382-400.

Moran M. J., Ayala M. E., Gallegos E., Romero J., Chavira R., Damián-Matsumura P., Domínguez R. (2012). Effects of systemic administration or intrabursal injection of serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in rats. *Reproduction, Fertility and Development*. 25(8), 1105-1114.

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

Niswender G. D., Juengel J. L., Silva P. J., Rollyson M. K., McIntush EW. (2000). Mechanisms controlling in the function and life span of the corpus luteum. *Physiological Reviews*. 80, 1-29.

Niswender, G.D., Nett, T.M. (1994). Corpus luteum and its control in infraprimate

species. En: *The Physiology of Reproduction*. 2 Ed. Ed. Knobil, E. and Neill, J.D. Raven Press, Ltd. New York, pp. 781-816.

Ojeda S. R., Advis J. P., Andrews W. W. (1980). Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation Proceedings*. 39, 2365-2371.

Ojeda S. R., Skinner M. K. (2006). Puberty in the rat. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3° edicion San Diego: Academic Press, pp. 2061-2126.

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 V. A. (2013). Perinatal exposure to fluoxetine via placenta and lactation inhibits the testicular development in male rat offspring. *System Biology in Reproductive Medicine*. 59, 244-255.

O'Steen, W. K. (1964). Suppression of luteinization with serotonin in gonadotrophin-treated immature rat. *Endocrinology*. 74, 885-888

Overgaard A., Lie M. E. K., Jorgensen C. V., Mikkelsen J. D., Knudsen G. M., Frokjaer V. G. (2013). Serotonin transporter binding is increased by a gonadotropin-releasing hormone agonist in female rats. *Basic and clinical neuroscience – Neuropharmacology*. 23(2), S193-S194.

Paxinos G., Watson C. (1982). *The rat brain in stereotaxic coordinates*. Academic Press Australia.

Piacsek B. E., Streur W. J. (1975). Effect of exposure to continuous light on estrogen-induced precocious sexual maturation in female rats. *Neuroendocrinology*. 18, 86-91.

Polanski Z. y Kubiak J. (1999). Meiosis. En: Knobil E., Neill J. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction*. Vol. 3. San Diego: Academic Press, pp. 160-167.

Prieto G. B., Velázquez P. M. (2002). Monografía Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de las gonadotropinas. Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM. 45, 252-257.

Qu Y., Aluisio L., Lord B., Boggs J., Hoey K., Mazur C., Lovenberg T. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics on norfluoxetine in rats: increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 92 (3), 469–473.

Quirk S. M., Cowan R. G., Harman R. M., Hu C. L., Porter D. A. (2004). Ovarian follicular growth and atresia: The relationship between cell proliferation and survival. *Journal Animal Science*. 82, E40-E52.

Rajkovic A., Pangas A. S., Matzuk M. M. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. 3° edición San Diego: Academic Press, pp. 383-424.

Riboni L. (1998). Estudio de los mecanismos neuroendocrinos que participan en el control de la pubertad de la hembra. La cobaya como modelo. , Tesis de Doctorado, Doctor en ciencias, U. N. A. M., México. D.F.

Ross M. H., Gordon I. K., Wojciech P. (2004). *Histología (texto y atlas color con biología celular y molecular)*. 4ta edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina.

Rossi A., Barraco A., Donda P. (2004). Fluoxetine: a review on evidence based medicine. *Annals of general hospital psychiatry*. 3:2 Medical department.

S.S.A. Catálogo de Medicamentos Genéricos Intercambiables para farmacias y público en general al 3 de agosto de 2007.

Baumel S. (1997), "Serotonin" how to naturally harness the power behind Prozac and

phen/fen. keats publishing Inc. New Canaan, Connecticut, pp. 20-23.

Tanaka E., Baba N., Toshida K., Suzuki K., (1993). Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptor. *Life Sciences*. 53 (7), 563–570.

Tinajero J. C., Fabbri A., Ciocca R. D., Dufau L. M. (1993). Serotonin secretion from rat Leydig cells. *Endocrinology*. 128, 3026-3029.

Tortora G. J., Derrickson B. (2006). *Principios de Anatomía y Fisiología*, 11<sup>a</sup> edición, Editorial Panamericana, pp. 629, 1077-1083.

Tresguerres J. A. F., Castillo C. (2000). “Fisiología del sistema endocrino” Editorial McGraw Hill, pp. 1007-1023.

Vitale M. L., Chiochio S. R. (1993). Serotonin, a neurotransmitter involved in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocrine Reviews*. 14, 480–493.

Walther D. J., Bader M., (1999). Serotonin synthesis in murine embryonic stem cells. *Brain Research Molecular Brain Research*. 68 (1-2), 55–63.

Walther D. J., Bader M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. *Biochemical Pharmacology*. 66 (9), 1673–1680.

Wassarman P. M., Liu C., Litscher S. E. (1996). Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *Journal of Cell Science*. 109, 2001-2004.

Wassarman P., Albertini D. (1994). The mammalian ovum. En: *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction*. New York: Raven Press, Ltd., pp. 79-122.

Wen S.W., Yang Q., Garner P., Fraser W., Olatunbosun O., Nimrod C., Walker M.

(2006). Selective serotonin reuptake inhibitors and adverse pregnancy outcomes. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*. 194 (4), 961–966.

Wogelius P., Norgaard M., Gislum M., Pedersen L., Munk E., Mortensen P. B., Lipworth L., Sorensen H. T. (2006). Maternal use of selective serotonin reuptake inhibitors and risk of congenital malformations. *Epidemiology*. 17 (6), 701–704.

Wong D. T., Hornq J. S., Bymaster F. P., Hauser K. L., Molloy B. B. (1974). A selective inhibitor of serotonin uptake: LILLY 110140, 3-(p-trifluoromethylphenoxy)-n-methyl-3-phenylpropylamine. *Life Sciences* 15, 471-479.

Wong D. T., Perry K. W., Bymaster F. P. (2005). The discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nature Publishing Group. Review Drug discovery*. 4(9), 764-74.

Yen S. C. S., Jaffe R. B., Barbieri L. R. (2001). *Endocrinología de la reproducción: fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4° edición, Ed. Médica Panamericana S.A. Buenos Aires, Argentina.

Zitterl W., Demal U., Aigner M., Lenz G., Urban C., Zapotoczky H-G., Zitterl-Eglseer K. (2000). Naturalistic Course of Obsessive Compulsive Disorder and Comorbid Depression. *Psychopathology*. 33 (2), 75-80.

Zoller L, Weisz J. (1978). Identification of cytochrome P-450, and its distribution in the membrana granulosa of the preovulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinology*. 103, 310-313.