



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE  
p-CLOROANFETAMINA EN LA ENZIMA  
AROMATASA, EL RECEPTOR A  
SEROTONINA 5-HT<sub>7</sub> Y LA APOPTOSIS  
EN EL OVARIO DE LA RATA PREPÚBER.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G A

PRESENTA:

MAGALY GARCÍA GALICIA

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo  
financiero de DGAPA-PAPIIT, Convenios IN223714 y IN226017



CDMX

SEPTIEMBRE, 2018





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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

Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina en la enzima aromatasa, el receptor a serotonina 5-HT<sub>7</sub> y la apoptosis en el ovario de la rata prepúber.

Tesis que para obtener el título de bióloga presenta: García Galicia Magaly

Directora de tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Realizada en el laboratorio de pubertad de la unidad de investigación en biología de la reproducción, UMIEZ. FES Zaragoza. UNAM.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA-PAPIIT, Convenios IN223714 y IN226017



# Agradecimientos

---

*A la Dra. María Elena Ayala Escobar por el apoyo brindado para la culminación de este trabajo.*

*A los miembros del jurado.*

*M. en BSH. Angélica Flores Ramírez*

*Dra. María Elena Ayala Escobar*

*M. en E.S. María Cristina Alvarado Domínguez*

*Dra. Juana Monroy Moreno*

*M. en C. Carlos Familo Silva Méndez*

*Por compartir sus conocimientos conmigo, por sus valiosas observaciones, asesoría y tiempo invertido durante la elaboración de este trabajo. Gracias por inspirarme durante mi formación académica.*

*A los Doctores Jessica Romero Reyes y Juan Antonio Díaz Ramos por su apoyo durante el proceso experimental de este trabajo.*

*A la Dra. Juana Monroy Moreno, por la disponibilidad en el uso de equipo necesario para la realización del presente trabajo y por su valiosa enseñanza.*

*A los profesores que de alguna manera marcaron mi formación académica con sus clases y algunos de ellos por los valiosos consejos y de manera especial a los profesores que impulsaron mi enteros por el área del desarrollo. Alvarado Domínguez María Cristina, Ayala Hernández Magdalena, Becerril Cruz Florencia, Castillejos Cruz Carlos, Espitia Licea Rocío, Guzmán Santiago José Luis, Ledesma Martínez Edgar, Mendieta Márquez Enrique, Niño de Rivera Oyarzabal María del Carmen, Peña Mendoza Bertha, Ramírez Diego Nicté, Rojas Pháñez Sonia, Roldán Pérez Reynalda, Romero Arredondo Juan, Rosas Saucedo Patricia, Sánchez García Figueroa Francisca Leonora y Valdivia Anistro Jorge Antonio.*

*Al equipo de trabajo del laboratorio 5 de pubertad, por aportar sus conocimientos, su tiempo y por su compañía durante la estancia en el laboratorio. Jessi, Adrian, Jess y Juan, me llevo su amistad*

*A la Dra. Adriana Altamirano Bautista y al Dr. Román Hernández Meza, responsables del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, U.N.A.M., por su valiosa colaboración al haber proporcionado y cuidado a los animales utilizados en este estudio.*

*A todas las personas que conforman la unidad de investigación de biología de la reproducción.*

*A mi amada universidad, la U.N.A.M., mi alma máter, por las múltiples enseñanzas obtenidas a lo largo de mi estancia en ella, por la oportunidad de relacionarme con excelentes profesores y compañeros, por el grato ambiente universitario pero sobre todo por formarme como profesionista y transmitirme amor a mi carrera. ¡POR MI RAZA HABLARA EL ESPÍRITU!*



## Dedicatorias

---

*Al que está sentado en el trono, gratitud eterna por todo lo recibido a lo largo de mi vida. ¡Tanta gloria me asombra!*

*A mi mamá: Magdalena, la mujer más admirable, que me ha enseñado muchas cosas, pero especialmente a confiar en Dios, a nunca rendirme, a ser agradecida y honesta, eres mi más grande ejemplo de vida, nunca podré pagar todo lo que me has dado, cada día de dedicación, esfuerzo y amor, por inspirarme a ser mejor cada día, y por impulsarme a iniciar y terminar la carrera. Este logro es tuyo también. Mereces mucho más, pero por ahora este es un pequeño reconocimiento y recordatorio de lo mucho que te quiero, eres mi tesoro Gracias ¡Eres la mejor! ¡Te amo y te admiro como a nadie!*

*A mi linda hermana y mejor amiga: Citlali, por enseñarme tanto sobre ser fuerte y valiente, por tus consejos, por tu apoyo que siempre es incondicional, por las locuras y buenos ratos que hemos pasado juntas y por todas las que nos faltan, por despertar mi lado divertido con tu alegría, eres una estrellita en mi vida, porque en la dualidad de nuestras personalidades, amo que me complementas en muchas formas. Sé que siempre estaremos juntas. ¡Gracias Phari, Te amo mucho!*

*A mi sobrino Jireh, porque a pesar de ser tan pequeño es un gran ejemplo de fortaleza y valentía, por ser mi inspiración, mi alegría, mi sol, mi luna y mis estrellas y enseñarme que la fuerza no viene de la capacidad física, sino de la voluntad.*

*A mi Tita Pharis, por todos los cuidados y el apoyo desde pequeña, por sus enseñanzas, por amarme como lo hace porque en sus detalles dice más que las palabras y por desear siempre lo mejor para mí. La considero otra mamá. ¡Gracias!*

*A Roberto, por siempre apoyarme, por impulsar y motivar mi desarrollo académico, y mi vida, amo compartir la misma pasión y manías, por creer que puedo lograrlo todo y hacérmelo ver a mí también, por tus ojos de borrego, por tanto amor, tiempo, esfuerzo y felicidad, pero sobre todo por lidiar con mi humor cuando fracaso y serenarme. Hemos crecido y aprendido mucho juntos. Siempre serás tú Phari. ¡Gracias!*

*A la familia Galicia Rodríguez, por todo el apoyo durante mi vida, a mi tía Silvia por su cariño, a mis primas Edith y Alicia que son un ejemplo para mí y en especial a mi tío favorito Pablo, por los regaños y consejos, sin su apoyo no lo habría logrado, tiene mi amor y admiración. ¡Si las cosas fueran fáciles, cualquiera las haría! no lo olvido.*

*A la familia Cruz García, por mantenerse constantes en mi vida a pesar de las circunstancias. En especial a mi tía Tme, por tenderme la mano cuando lo he necesitado por estar siempre pendiente de mí y amarme tanto. ¡Gracias!*

*A mis abuelitos Juan y Petra, pues ellos son los cimientos y unidad de la grande y hermosa familia a la que pertenezco.*

*A Karen por su impulso para la culminación de este trabajo con sus constantes ¿Para cuándo terminas esa tesis?*

*A Brenda y Pino, para que vean que sí cumplo y me acuerdo de ellos donde otros más los han olvidado.*



*A mis amigos:*

*A Pas y Mary por ser tan lindas conmigo, he descubierto en ustedes una amistad incondicional y constante, por los lindos ratos que pasamos dentro y fuera de la facultad. Y porque estoy segura que vendrán más ¡Las quiero mil niñas!*

*A Beto, Phoche, Edgar, Emi, Leslie, Liz y Mari, por los increíbles momentos juntos, siempre me la paso genial con ustedes, por alegrarme la vida y estar para mí a lo largo de toda la carrera. ¡Los quiero mucho bebés, son geniales!*

*A Mario y Vladis, por su compañía y cariño por tantas bobadas y consejos de machos y a Axel, pues sin darte cuenta de alguna forma impulsaste mi pensar y representas para mí un ejemplo de crecimiento académico.*

*A Carmen, Lau y Omar, pues empezamos juntos la carrera y a pesar del tiempo y la distancia seguimos siendo amigos. Se que no soy la mejor amiga que pudieron encontrar, pero tienen un lugar especial en mi corazón. ¡Los quiero!*

*A César, Samara y Marco, mis confidentes de años, por su amistad invaluable y perdurable, por escucharme en los momentos difíciles, pero también porque hemos compartido muchas experiencias lindas. ¡Los quiero y eso cuenta!*

*A Gabby y Jonathan amigos increíbles que han estado conmigo por años. Sobrevivimos al tiempo y la distancia, aunque hemos cambiado mucho siempre serán parte de mi vida. ¡Gracias por cada momento! ¡Los quiero!*

*Gracias a todos por su amistad, por estar para mí en diferentes etapas y por alegrarme la vida con su presencia.*

*A todas las personas que han formado parte de mi vida en algún momento, a las que me han amado y a las que de forma positiva me han impulsado a ser una mejor versión de mí. Espero de algún modo impulsar (como lo hicieron conmigo) a Diana, Huelnesoi, Dany, Gael, Fanny, Wendy, Wazzy, AHIRAM, Aldo, Mary y Jireh para seguir el fructífero camino del estudio.*

*"No pretendamos que las cosas cambien, si siempre hacemos lo mismo. La crisis es la mejor bendición que puede sucederle a personas y países, porque la crisis trae progresos. La creatividad nace de la angustia como el día nace de la noche oscura. Es en la crisis que nace la inventiva, los descubrimientos y las grandes estrategias. Quien supera la crisis se supera a sí mismo sin quedar 'superado'. Quien atribuye a la crisis sus fracasos y penurias, violenta su propio talento y respeta más a los problemas que a las soluciones. La verdadera crisis es la crisis de la incompetencia. El inconveniente de las personas y los países es la pereza para encontrar las salidas y soluciones. Sin crisis no hay desafíos, sin desafíos la vida es una rutina, una lenta agonía. Sin crisis no hay méritos. Es en la crisis donde aflora lo mejor de cada uno, porque sin crisis todo viento es caricia. Hablar de crisis es promoverla, y callar en la crisis es exaltar el conformismo. En vez de esto, trabajemos duro. Acabemos de una vez con la única crisis amenazadora, que es la tragedia de no querer luchar por superarla." "Estoy absolutamente convencido de que la ciencia y la paz triunfan sobre la ignorancia y la guerra, que las naciones se unirán a la larga no para destruir sino para edificar, y que el futuro pertenece a aquellos que han hecho mucho por el bien de la humanidad. Estoy absolutamente convencido de que la ciencia y la paz triunfan sobre la ignorancia y la guerra, que las naciones se unirán a la larga no para destruir sino para edificar, y que el futuro pertenece a aquellos que han hecho mucho por el bien de la humanidad."*

*Albert Einstein (Alemania, 1879-1955)*



*Llama con todas tus fuerzas a la inteligencia y pide a gritos entendimiento. Busca la sabiduría como si fuera plata, como si fuera un tesoro escondido. Entonces aprenderás a respetar al Señor, y sabrás lo que es conocer a Dios. Porque Él es el que da la sabiduría, el conocimiento y la ciencia brotan de sus labios. Él da sabiduría a la gente que es justa con los demás, y protege a los que viven honestamente, cuida el camino de los justos y protege la senda de los que le son fieles. También comprenderás lo que es la justicia, la honestidad y la igualdad, y todo buen camino.*

*Proverbios 2:3-9(PDT)*

*"Cada (tic-tac) es un segundo de la vida que pasa, huye, y no se repite. Y hay en ella tanta intensidad, tanto interés, que el problema es sólo saberla vivir. Que cada uno resuelva como pueda"*

*Magdalena Carmen Frida Kahlo Calderón (Mexicana 1907-1954)*

*"Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico. es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas."*

*Marie Salomea Skłodowska Curie (Polaca, 1867-1934)*

*"La ciencia no sólo es una disciplina de la razón, sino también del romance y de la pasión."*

*Stephen William Hawking (Británico 1942)*

*"No es la más fuerte de las especies la que sobrevive, tampoco es la más inteligente la que sobrevive. Es aquella que se adapta más al cambio."*

*Charles Robert Darwin (Inglés, 1809-1882)*

*"Es preciso sacudir enérgicamente el bosque de las neuronas cerebrales adormecidas; es menester hacerlas vibrar con la emoción de lo nuevo e infundirles nobles y elevadas inquietudes." "Las neuronas son células de formas delicadas y elegantes, las misteriosas mariposas del alma, cuyo batir de alas quién sabe si esclarecerá algún día el secreto de la vida mental."*

*Santiago Ramón y Cajal (Español, 1852-1934)*

*"No importa cuántas veces caigas, lo importante es levantarte para convertirte en una mejor versión de ti"*

*(Mamá)*



# Índice

---

Abreviaturas.....	i
Resumen.....	iii
Introducción.....	1
Marco teórico.....	3
Ovario.....	3
Estructura del ovario.....	3
Desarrollo folicular.....	5
Folículo primordial.....	6
Folículo primario.....	6
Folículo secundario.....	7
Folículo preovulatorio.....	8
Regulación hormonal del desarrollo folicular.....	9
Atresia folicular.....	11
Apoptosis.....	14
Relación entre hormonas y apoptosis.....	17
Síntesis de hormonas esteroides.....	18
Enzima aromatasa.....	21
Serotonina.....	22
Recetor 5-HT <sub>7</sub> .....	27
Serotonina, funciones y eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	28
Anfetaminas.....	29
p-Cloroanfetamina.....	32
Justificación.....	34
Hipótesis.....	35
Objetivo general.....	36
Objetivos particulares.....	36
Materiales y método.....	37
Animales.....	37
Grupos experimentales.....	37
Administración de pCA y solución salina.....	37
Procedimiento de autopsia.....	37
Deshidratación, Inclusión y cortes histológicos.....	38

---



Detección de apoptosis.....	39
Cuantificación de estradiol .....	40
Detección de enzima aromatasa y receptor 5-HT <sub>7</sub> .....	41
Análisis estadístico .....	42
Resultados .....	43
Apoptosis .....	44
Estradiol .....	49
Aromatasa .....	50
Receptor 5-HT <sub>7</sub> .....	52
Discusión .....	55
Conclusiones .....	60
Referencias.....	61
Congresos .....	85



## Abreviaturas

3 $\beta$ HSD	Enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa
5-HIAA	Acido 5 hidroxindolacético
5-HT	Serotonina
A	Adrenalina
ADN	Acido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
Ca	Calcio
D1	Diámetro 1
D2	Diámetro 2
DA	Dopamina
DP	Diámetro promedio
E2	Estradiol
EGF	Factor de crecimiento epidérmico
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de a
H	Horas
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
Kg	Kilogramos
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
LDLR	Receptores a lipoproteínas de baja densidad
LH	Hormona luteinizante
LSD	Dietilamida de ácido lisérgico
MAO	Monoamino oxidasa
MDA	Metilendioxianfetamina
MDE	Metilendioxietilamfetamina
MDMA	Metilendioximetamfetamina
mg	Miligramos
ml	Mililitro
NA	Noradrenalina
NDR	Núcleo Dorsal del Rafe
NGF	Factor de Crecimiento Neuronal
NMR	Núcleo Medial del Rafe
NPR	Núcleo del Puente del Rafe
OMI	Inhibidor de la maduración ovocítica
PC	Peso corporal
pCA	p-Cloroanfetamina
P450arom	Enzima aromatasa
P450c17	Enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa
P450scc	Enzima desmolasa
R-FSH	Receptor a Hormona Folículo Estimulante
R-LH	Receptor a Hormona Luteinizante



## García Galicia Magaly

SERT	Transportador de serotonina
TA	Testigo absoluto
TPH	Enzima triptófano hidroxilasa
TGF $\alpha$	Factor de Crecimiento Tumoral Alfa
TGF $\beta$	Factor de Crecimiento Tumoral Beta
TUNEL	TDT- mediated dUTP Nick end labelling
VH	Vehículo
VMAT	Transportador vesicular de monoamina
$\mu\text{m}$	Micrómetros





## Resumen

---

A la serotonina se le identifica en los componentes del eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-ovario. En la rata adulta o prepúber (30 días de edad), modula la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y la producción de estradiol, factor que mantiene la sobrevivencia de las células de la granulosa del folículo ovárico. Es posible que la acción de la serotonina en el ovario sea vía la unión a su receptor 5-HT<sub>7</sub>, que se ha identificado en el ovocito y en las células del cumulus del folículo en el ratón. Se ha mostrado que diversas sustancias, como los derivados de las anfetaminas inhiben la actividad del sistema serotoninérgico, sin embargo sus efectos en la reproducción son poco conocidos. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de un derivado de las anfetaminas, la p-Cloroanfetamina (pCA), en el desarrollo folicular y la apoptosis. En el ovario también se identificó al receptor 5-HT<sub>7</sub>, y la enzima aromatasa que transforma la testosterona a estradiol.

Se utilizaron ratas hembras de 30 días de edad de la cepa CII-ZV a las que se les administraron 10 mg/Kg de p.c. de pCA; como grupos de comparación se utilizaron animales inyectados con solución salina (0.9 %) o sin tratamiento (TA). Los animales se autopsiaron a las 120 h postratamiento. En el suero se cuantificó la concentración de estradiol, la presencia de apoptosis se evaluó por la técnica de TUNEL y el receptor 5-HT<sub>7</sub> y la aromatasa por inmunohistoquímica.

En los animales a los que se les administro pCA se incrementó el número de folículos totales. Este efecto es el resultado del aumento de los folículos de las clases 3 (200-349  $\mu$ m) y 5 (500-999  $\mu$ m). El número de folículos en las diferentes etapas de desarrollo con células positivas a TUNEL se incrementó en comparación con el grupo TA o el grupo inyectado con VH. La concentración de estradiol disminuyo significativamente en el suero de los animales a los que se les administró pCA. Esto se acompañó de la disminución de los folículos de la clase 4 (350-499  $\mu$ m) que presentaron marca positiva para la enzima aromatasa y para el receptor 5-HT<sub>7</sub>.





*García Galicia Magaly*

iv

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que la administración de p-Cloroanfetamina disminuye la producción de estradiol en el ovario, lo que se acompaña de la muerte celular por apoptosis en las células de la granulosa y la atresia del folículo ovárico. Así mismo, la serotonina actúa en las células del cumulus y ovocito y como consecuencia en la fisiología del folículo ovárico.



## Introducción

---

El ovario cumple dos funciones, la secreción de hormonas esteroideas y proteicas, así como la producción de óvulos. Estas funciones, son reguladas por las gonadotropinas, [hormona estimulante del folículo (FSH) y Luteinizante (LH)], el estradiol, los factores de crecimiento y las aminos como la serotonina (Clasell y Soliman, 1978; Tanaka y col., 1993; Erickson, 2001; Hu y col., 2010).

En el SNC la serotonina es un neurotransmisor y regula la secreción de factores liberadores por el hipotálamo, como la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Brown, 1994; Gouveia y Rodríguez, 2004; Jorgensen, 2007; Berger y col., 2009). Lo que dio la pauta a proponer que la serotonina participa en la regulación de las funciones del ovario, esteroidogénesis y ovulación (Berger y col., 2009; Morán y col., 2013). También se asocia a la serotonina con procesos de proliferación y diferenciación celular, así como en la apoptosis en el pulmón, el riñón, células endoteliales y neuronas. Su participación en tales eventos depende del tipo de receptor al que se une (Jacobs y Azmitia, 1992; Azmitia, 2001; Whitaker-Azmitia y col., 2001; Jorgensen, 2007; Mohammad-Zadeh y col., 2008; Nichols y Nichols, 2008; Sánchez-López y col., 2009).

Las anfetaminas y sus derivados, a corto plazo, 24 horas, inducen la liberación de algunas monoaminas como la serotonina (Utrilla, 2000; castellano y Acosta 2011) y bloquean la actividad de la enzima monoamino oxidasa, que se encarga de la inactivación y degradación de la serotonina. Después de las 24 horas, inhiben la actividad de la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la triptófano hidroxilasa, lo que se traduce en la disminución en la concentración de serotonina, e inhibición de la trasmisión serotoninérgica (Collado, 2008; Castellanos y Acosta, 2011). Un derivado de las anfetaminas que induce daños selectivos en el sistema serotoninérgico, es la p-Cloroanfetamina (Utrilla 2000; Lorenzo y Lizasoain 2003). En



la rata hembra prepúber, la administración de serotonina en disminuye la concentración de estradiol e induce la atresia del folículo ovárico (Morán y col., 2013).

Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de p-Cloroanfetamina en la apoptosis en el folículo ovárico, así como en la producción de testosterona y estradiol; así como en la identificación del receptor 5-HT<sub>7</sub> y de la enzima aromatasa que transforma la testosterona en estradiol.

## Marco teórico

### Ovario

En la mujer los ovarios son estructuras pares, se alojan en la pelvis a la entrada de las trompas de falopio unidos al útero y fijados a la superficie posterior del ligamento ancho por medio de un pliegue peritoneal denominado mesovario, a través del cual la gónada recibe su aporte nervioso vascular y linfático (Tresguerres, 2000; Roos y Wojciech, 2007). El polo superior del ovario, denominada tubárico se une al ligamento lumboovárico; el polo inferior o uterino se une al útero por el ligamento ovárico (Roos y Wojciech, 2007) (Figura 1).

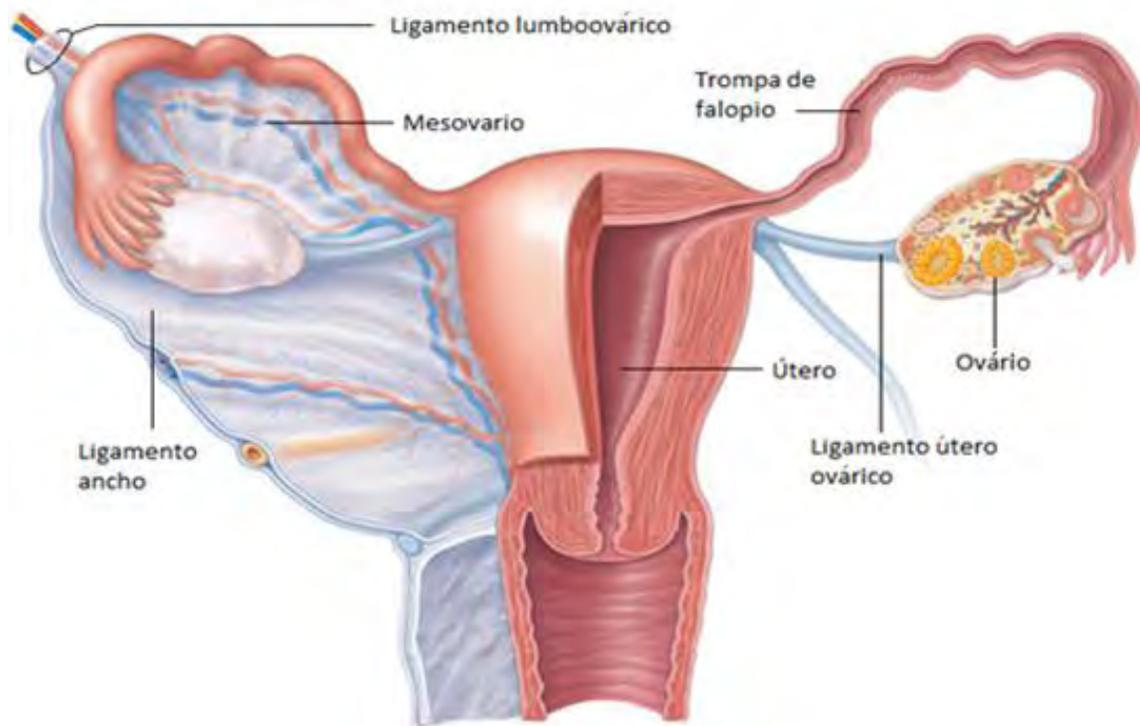


Figura. 1. Órganos sexuales internos femeninos y ligamentos que sostienen al ovario: lumboovárico, mesoovárico, uteroovárico y ligamento ancho. Modificada de Roos y Wojciech, 2007.

### Estructura del ovario

La superficie del ovario está cubierta por un epitelio cúbico, el epitelio superficial, debajo de éste se encuentra una capa de tejido conectivo, la túnica albugínea bajo estas dos capas se identifican dos zonas: la médula y la corteza



(Roos y Wojciech, 2007; Orsi y col., 2014). La médula o región central contiene tejido conjuntivo laxo, nervios, vasos sanguíneos y linfáticos. La corteza se ubica en la periferia, conformada de tejido conjuntivo en el que se encuentran inmersos los folículos ováricos, en diferentes estadios de desarrollo y los cuerpos lúteos (Tresguerres, 2000; Fawcett, 2005; Roos y Wojciech, 2007) (Figura 2).

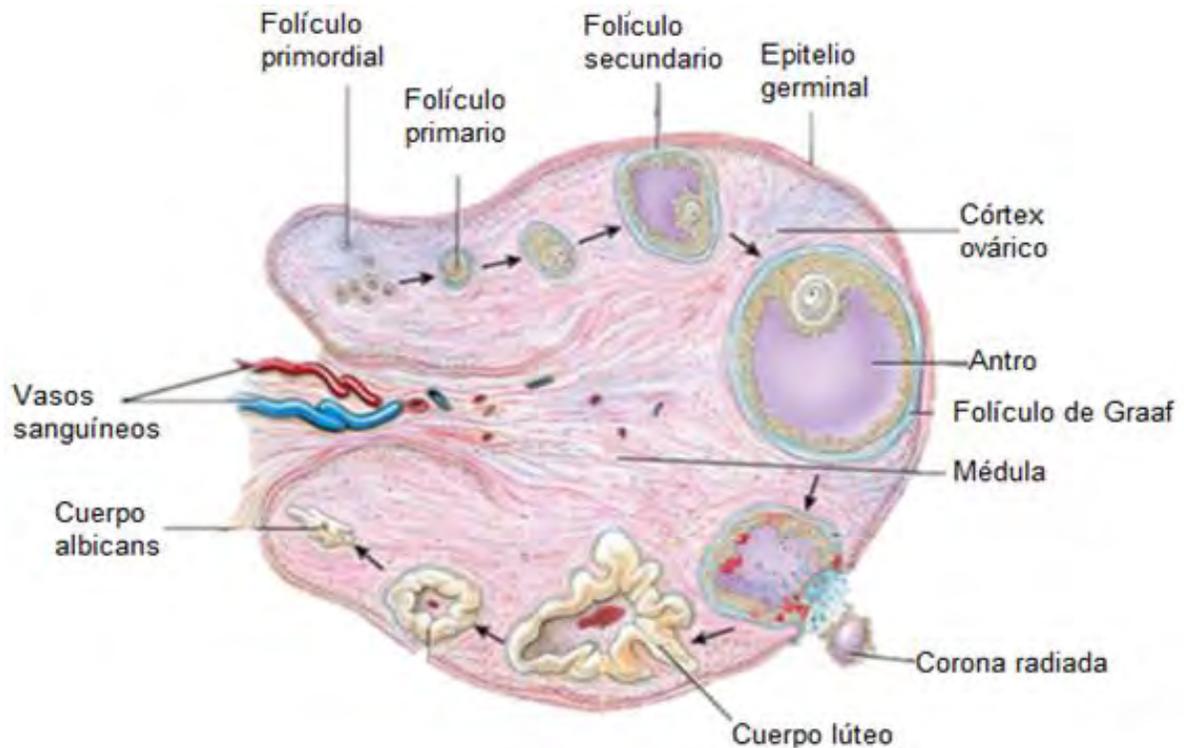


Figura. 2 Estructura del ovario. Donde se identifica el epitelio superficial o germinal, túnica albugínea, médula y corteza, así como los folículos en diferentes estadios de desarrollo (primordial, primario, secundario, terciario y pre-ovulatorio) y el cuerpo lúteo. Modificada de Tortora, 1999.

El ovario lleva a cabo dos funciones, la maduración y liberación de los óvulos y la síntesis de hormonas esteroides (sexuales y proteicos) y aminor. Las principales hormonas esteroides sexuales producidas por los ovarios son progesterona, testosterona y estradiol. Entre las proteicas se incluye la inhibina y la activina, factores de crecimiento como el epidermal (EGF) y el parecido a la insulina (IGF-I) (Vega, 1997; Findlay y col., 2000; Erickson y Shimasaki, 2001; Chedrese, 2003; Havelock y col., 2004; Roos y Wojciech, 2007).

## Desarrollo folicular

El folículo ovárico es la estructura anatómica y funcional del ovario a partir de la cual se forman los otros componentes del ovario, el cuerpo lúteo y la glándula intersticial. Al folículo lo forma el ovocito, las células de la granulosa, la membrana basal y las células de la teca. El ovocito mide entre 20y 70  $\mu\text{m}$  dependiendo de la etapa de desarrollo. A esta célula lo rodea una o varias capas de células foliculares o de la granulosa, adyacente a ésta, se encuentra la membrana basal, que separa a las células de la granulosa de las más externas, las células de la teca, que se identifican a partir del folículo secundario y se divide en interna y externa (Estrada, 2002; Fawcett y col., 2005; Roos y Wojciech, 2007).

En los mamíferos las células germinales primordiales dan origen a las ovogonias, que se dividen por mitosis y forman los ovocitos primarios que al ser rodeados por una capa de células foliculares aplanadas, constituyen al folículo primordial (Gal, 2007; Silbernagl, 2009; Barrett y col., 2010). El folículo pasa por diferentes estadios de desarrollo que se caracterizan por cambios en su volumen, en el número de capas de células de la granulosa y tamaño del ovocito (Figura 3). Con base en estos aspectos, se les clasifica en primordiales, primarios, secundarios o en crecimiento y maduros o preovulatorio (Fawcett y col., 2005; Tortora, 2006; Roos y Wojciech, 2007; Welsh, 2014).

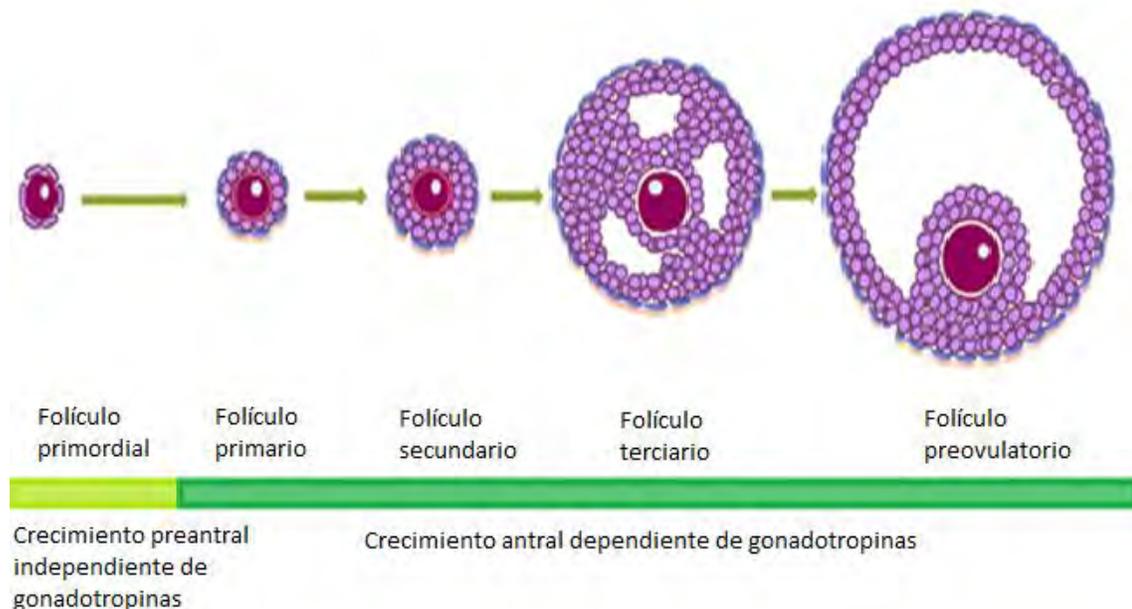


Figura. 3. Folículos en diferentes etapas de crecimiento. Modificada de Sánchez y Smitz, 2012.

### Folículo primordial

Lo conforma el ovocito de 20 a 25  $\mu\text{m}$  de diámetro, detenido en la profase de la primera división meiótica, ésta rodeado por una capa de 6 a 8 células foliculares aplanadas y rodeando a estas una lámina basal que aísla al folículo del resto del tejido ovárico. EL diámetro de este folículo es de aproximadamente 35 a 40  $\mu\text{m}$  (Figura 4). Las células de la granulosa no expresan receptores a la FSH. Lo que indica que su crecimiento es independiente de las gonadotropinas (Geneser, 2000; Druker, 2005; Roos y Wojciech, 2007).

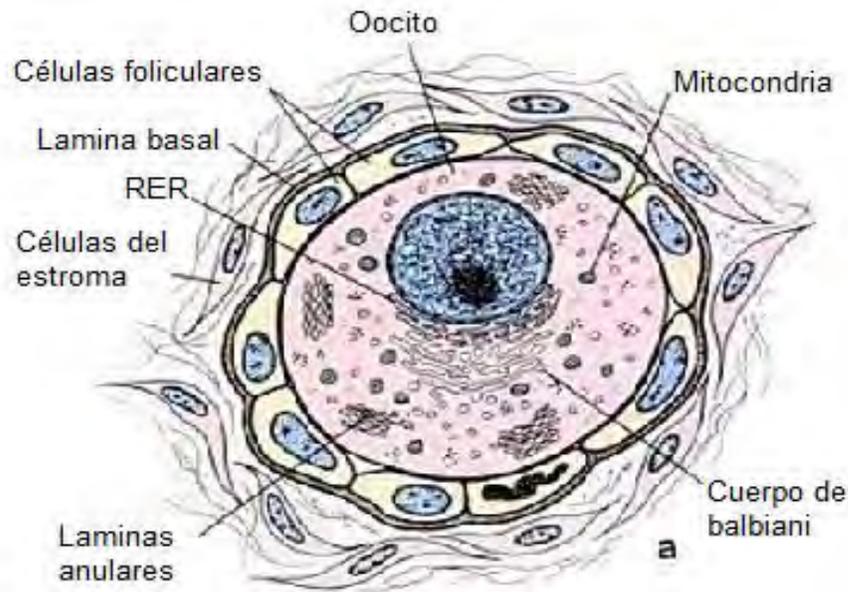


Figura. 4. Folículo primordial, se identifica el ovocito rodeado por la capa de células foliculares aplanadas. La superficie externa de estas células está separada del tejido conjuntivo por una lámina basal. Retículo endoplásmico rugoso (RER). Modificada de Roos y Wojciech, 2007.

### Folículo primario

Cuando el ovocito crece y alcanza un tamaño aproximado de 50 a 75  $\mu\text{m}$ , las células foliculares aplanadas circundantes proliferan y se tornan cúbicas (Figura 5). En esta etapa, recibe el nombre de folículo primario que alcanza un diámetro aproximado de 80 a 100  $\mu\text{m}$  (Fawcett y col., 2005; Roos y Wojciech, 2007; Ira, 2011). Durante el crecimiento del folículo, la zona pelúcida, que rodea al ovocito, se desarrolla y lo separa de las células foliculares. La lámina basal mantiene su posición entre el estroma del ovario y las células foliculares (Geneser, 2000; Barrett y col; 2010) (Figura 6).

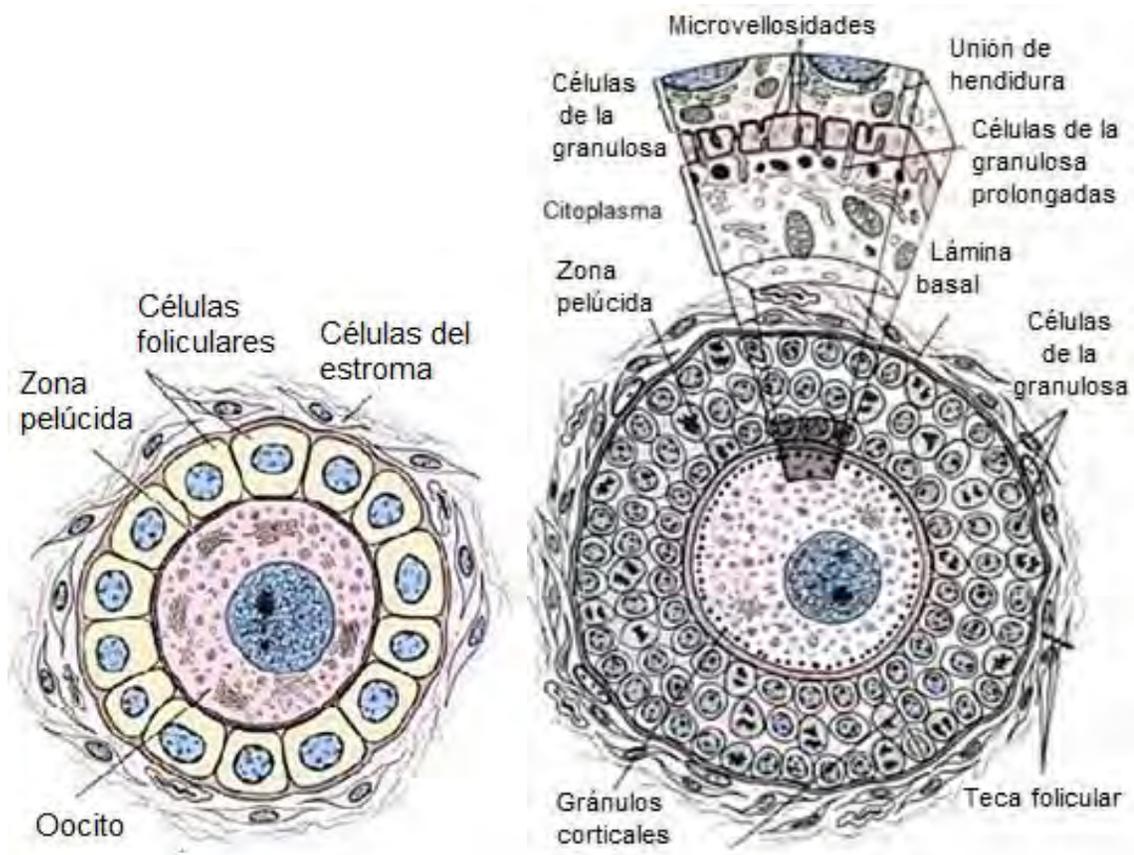


Figura. 5. Folículo primario, se observa la capa de células foliculares cúbicas que rodean al ovocito, la zona pelúcida y las células del estroma ovárico que rodean al folículo. Modificada de Roos y Wojciech, 2007.

Figura. 6. Folículo en crecimiento, se observa que el estrato más externo está apoyado sobre la lámina basal y varias capas de células de la granulosa rodeando al ovocito. Modificada de Roos y Wojciech, 2007.

### Folículo secundario

El folículo primario aumenta de tamaño debido a que las células de la granulosa se dividen y se forman diferentes estratos. El ovocito continúa creciendo hasta 80 a 100  $\mu\text{m}$  de diámetro (Silbernagl, 2009).

Cuando al folículo lo forman de 6 a 12 capas de células de la granulosa, aparecen entre ellas cavidades llenas de líquido, que al unirse forman una cavidad única, el antro folicular, es entonces cuando se le denomina folículo secundario o antral. Las células de la granulosa adyacentes al ovocito forman el *cumulus ophorus*, que se proyecta dentro del antro (Figura 7). Por fuera de la alamina basal se ubica la teca que se diferencia en dos capas: interna y externa. La teca interna es vascularizada y expresa receptores para la LH. La externa o superficial, contiene

células musculares lisas y haces de fibras de colágena (Roos, 2007). En esta etapa el folículo alcanza un diámetro aproximado de 150 a 300  $\mu\text{m}$  y requiere para su desarrollo de FSH, estradiol y factores de crecimiento como el de crecimiento epidérmico (EGF) (Geneser, 2000; Yen y col., 2001; Roos y Wojciech, 2007).

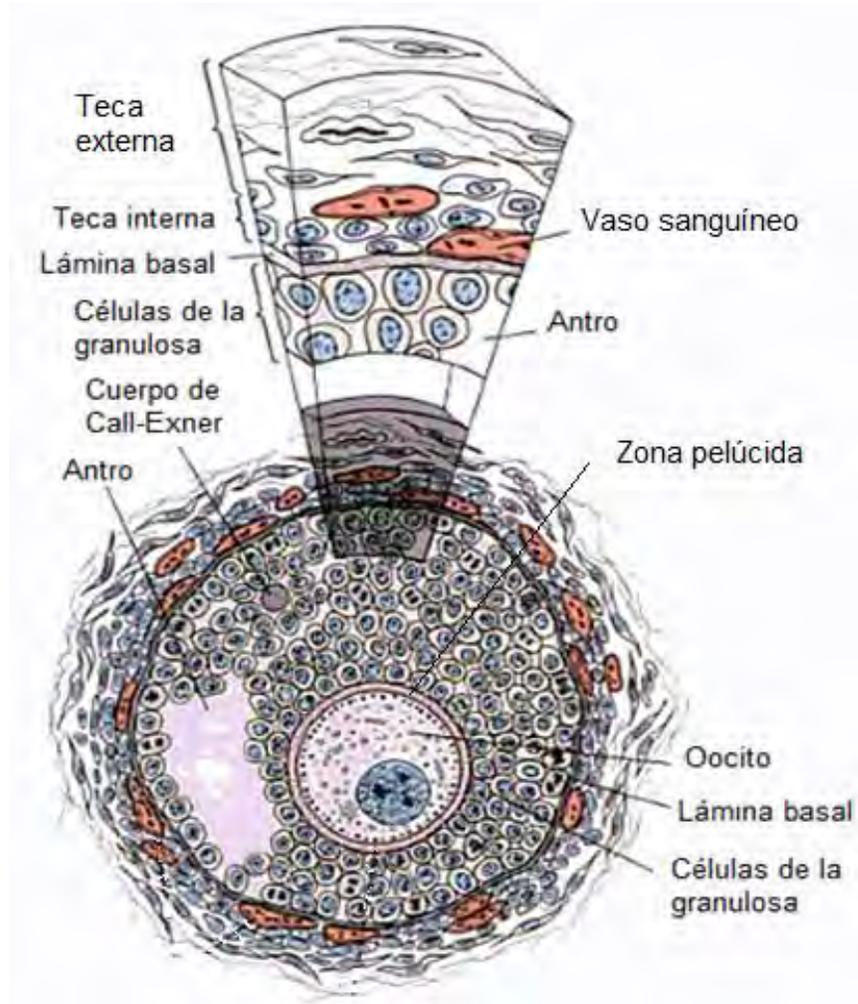


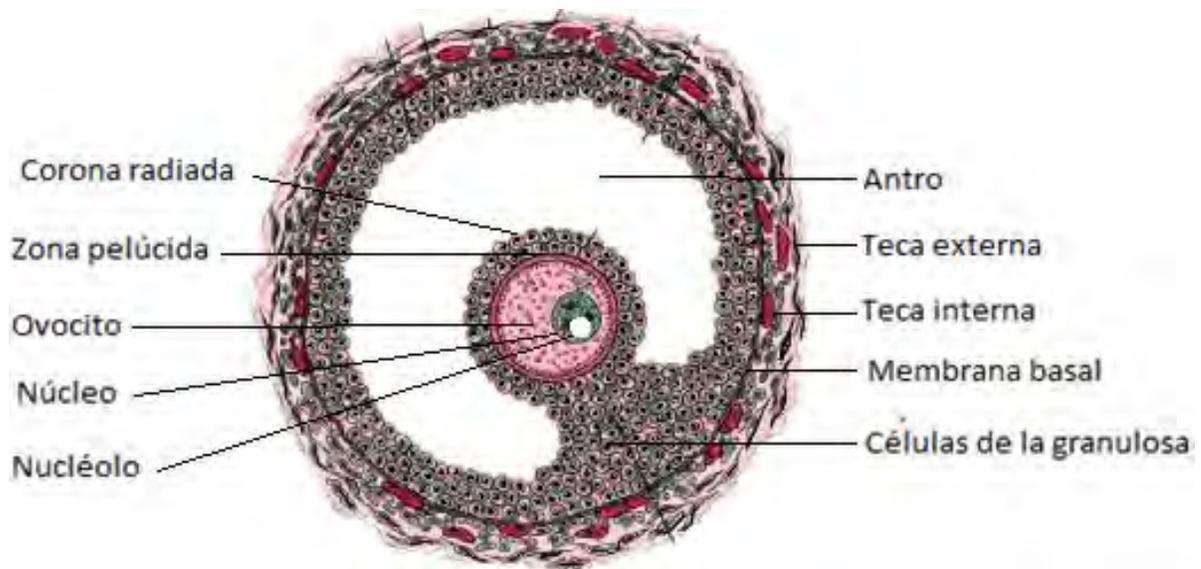
Figura. 7. Folículo secundario, se observa el antro que se forma por la confluencia de cavidades pequeñas entre las células de la granulosa, la lámina basal y las células de la teca interna y externa. Modificada de Roos y Wojciech, 2007.

### Folículo preovulatorio

El folículo maduro o de Graff se extiende por todo el espesor de la corteza. Continúa su crecimiento hasta alcanzar alrededor de 500-800  $\mu\text{m}$  de diámetro. El antro aumenta de tamaño y contiene el líquido folicular compuesto de agua, progesterona, testosterona, estradiol, factores de crecimiento GnRH y aminos. Rodeando al ovocito se encuentra la zona pelúcida formada por glicoproteínas. En

un extremo de la cavidad del folículo, el ovocito permanece suspendido unido a la granulosa por el *cumulus ophorus* (Tortora, 2006; Gal, 2007; Aldo, 2008; Ira, 2011). Un poco antes de la ovulación se inicia la elevación en la secreción de la LH, evento que es esencial para que se reactive la meiosis en el ovocito y concluya la primera división. Durante esta etapa del desarrollo la teca se torna prominente (Geneser, 2000; Roos y Wojciech, 2007; Silbernagl, 2009) (Figura 8).

Este folículo tiene una elevada actividad de citocromo-P450-aromatasa (P450arom), enzima presente en las células de la granulosa, se encarga de convertir los andrógenos en estrógenos, este es el folículo con mayor actividad aromatasa (Chedrese, 2003).



*Figura. 8. Folículo preovulatorio, se observa el antro en forma de semiluna, la corona radiada y el cumulus ophorus. Modificada de Roos y Wojciech, 2007.*

Después de la ovulación, en la corteza ovárica, las células de la teca y la granulosa del folículo se luteinizan y se forma el cuerpo luteo (Tesguerres y Castillo, 2000). Mientras que, los folículos que no alcanzan la madurez y no son ovulados, entran en un proceso de degeneración denominado atresia folicular (Chedrese, 2003).

### **Regulación hormonal del desarrollo folicular**

El mantenimiento de la estructura y funcionamiento del ovario son regulados por la LH y la FSH, cuya secreción es modulada por el hipotálamo vía la GnRH y por las hormonas secretadas por el propio ovario (Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000). La

liberación de la GnRH es regulada por algunos neurotransmisores y neuropéptidos, algunos de los cuales interactúan entre ellos o con los esteroides gonadales. La GnRH es sintetizada en neuronas que se localizan en el área preóptica del hipotálamo anterior (Tresguerres y Castillo, 2000; Ulloa-Aguirre y Timossi, 2000; Prieto y Vázquez, 2002; Silbernagl, 2009) (Figura 9).

El hipotálamo libera la GnRH al sistema portal-hipotálamo-hipofisario y es transportada hasta los gonadotropos, donde se une a sus receptores de membrana y desencadena la síntesis y liberación de las gonadotropinas, FSH y LH (Smith, 2001). La FSH y LH son glicoproteínas formadas por dos subunidades ( $\alpha$  y  $\beta$ ), que se unen a sus receptores de membrana en las células de la granulosa o la teca, respectivamente. Regulan el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico, la ovulación y la secreción de hormonas esteroides. Éstas actúan como factores intraováricos que modulan el desarrollo del folículo (Filicori, 1999; Brüssow y col., 2001; Hillier, 2001; Bernard y col., 2010) (Figura 9).

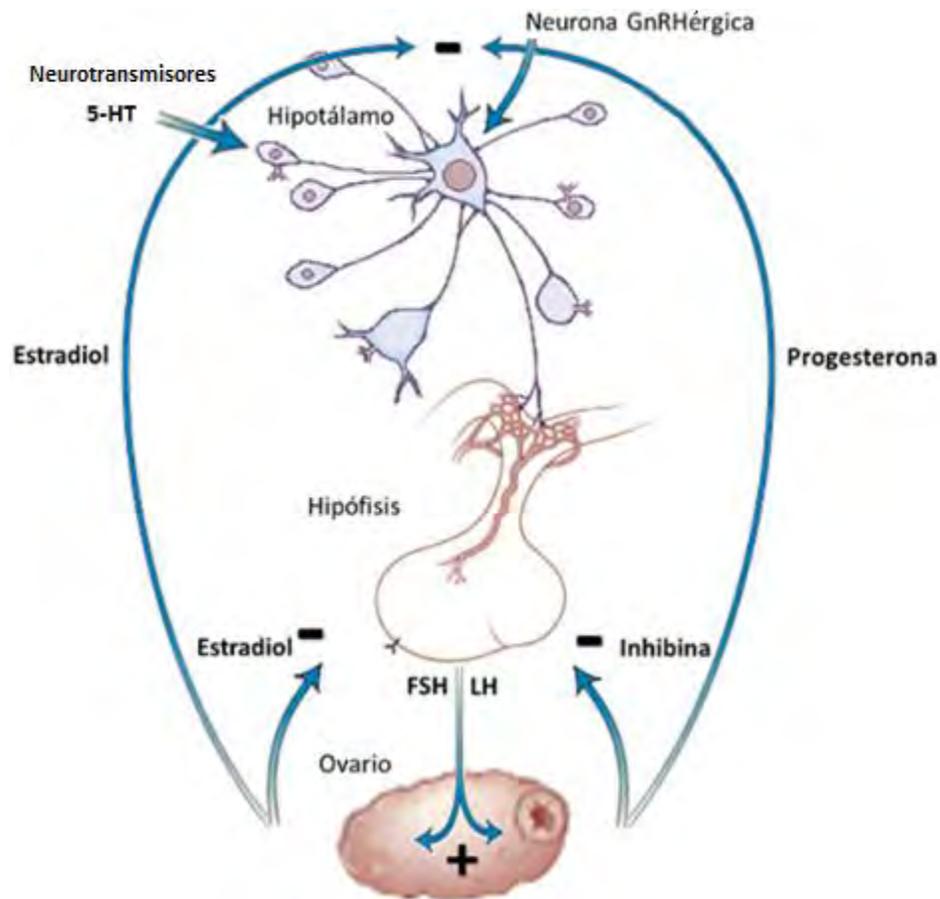


Figura. 9. Eje hipotálamo-hipofisario-ovario. 5-Hidroxitriptamina (5-HT) Hormona estimulante del folículo (FSH) y Luteinizante (LH). Modificada de Kronenberg, 2009.



En el ovario se presentan cambios cíclicos en su estructura, que son regulados por la FSH y LH. La FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa, el desarrollo y maduración del folículo, así como la síntesis de estrógenos y la formación de los receptores a la LH y de la prolactina (PRL) (Geneser, 2000; Ulloa y Timossi, 2000; Roos, 2007). La LH estimula el desarrollo folicular, la esteroidogénesis, la ruptura del folículo maduro o preovulatorio y la liberación del ovocito, ovulación (Ulloa y Timossi, 2000) (Yen, 2001; Richards, 2013).

El crecimiento del folículo primordial es independiente de las gonadotropinas porque no poseen receptores a estas hormonas. A partir del folículo secundario, las células foliculares responden a las gonadotropinas que favorecen su desarrollo (Mayerhofer y col., 1997; McGee y Hsueh 2000; Irusta, 2008). La formación de los andrógenos y estrógenos (Kronenberg, 2009; Dorrington y Armstrong, 2013; Dewailly y col., 2016).

Los estrógenos en el ovario ejercen una función autocrina y paracrina, debido a que inducen la mitosis y sobrevivencia de las células de la granulosa, lo que conduce al crecimiento del folículo; estimulan la expresión de los receptores a LH en las células de la teca y de FSH en granulosa. La concentración de estrógenos en el líquido folicular se asocia con el crecimiento folicular. Cuando disminuye su síntesis, se induce la atresia folicular (Billig y col., 1993; Tresguerres y Castillo, 2000; Britt y Findlay, 2002).

### Atresia folicular

La atresia folicular es un proceso de degeneración de los folículos ováricos que se produce en las células de la granulosa, de la teca y en el ovocito. Se presenta en todas las etapas del desarrollo del folículo y se encuentran implicados factores reguladores locales; como las hormonas esteroides sexuales, factores de crecimiento y citosinas (Ginther, 2000; Flores, 2005; Irusa, 2008; Matsuda y col., 2012) (Figura 10).

Durante la atresia, se observan cambios morfológicos en los componentes del folículo, como núcleos picnóticos, disminución de la mitosis de las células de la granulosa, desprendimiento de las células de la granulosa, separación del complejo cumulus-ovocito de la pared folicular, fragmentación de la membrana basal, infiltración de leucocitos entre las células de la granulosa, hipertrofia de las células de la teca y alteraciones en el ovocito. También ocurren cambios bioquímicos como

pérdida de uniones comunicantes; disminución del número de receptores a las gonadotropinas en las células de la teca y de la granulosa; disminución de las enzimas que participan en la síntesis de estrógenos,  $17\alpha$ -hidroxilasa y aromatasa, lo que provoca la disminución de la concentración de estrógenos y la acumulación de andrógenos (Yen y col., 2001; Rosales y Guzmán, 2008; Torres y Sánchez, 2012).



Figura 10. Reclutamiento inicial de folículos primordiales. Modificada de medicafertil.mx

La atresia folicular se lleva a cabo por dos tipos de muerte celular (Figura 11), la necrosis y la apoptosis. Este último proceso se presenta en las células de la granulosa de forma individual y se le asocia con la disminución en la concentración de FSH, LH, estradiol y el aumento de testosterona entre otros factores (Sánchez-Torres, 2003; Flores, 2005; Rosales y Guzmán, 2008).

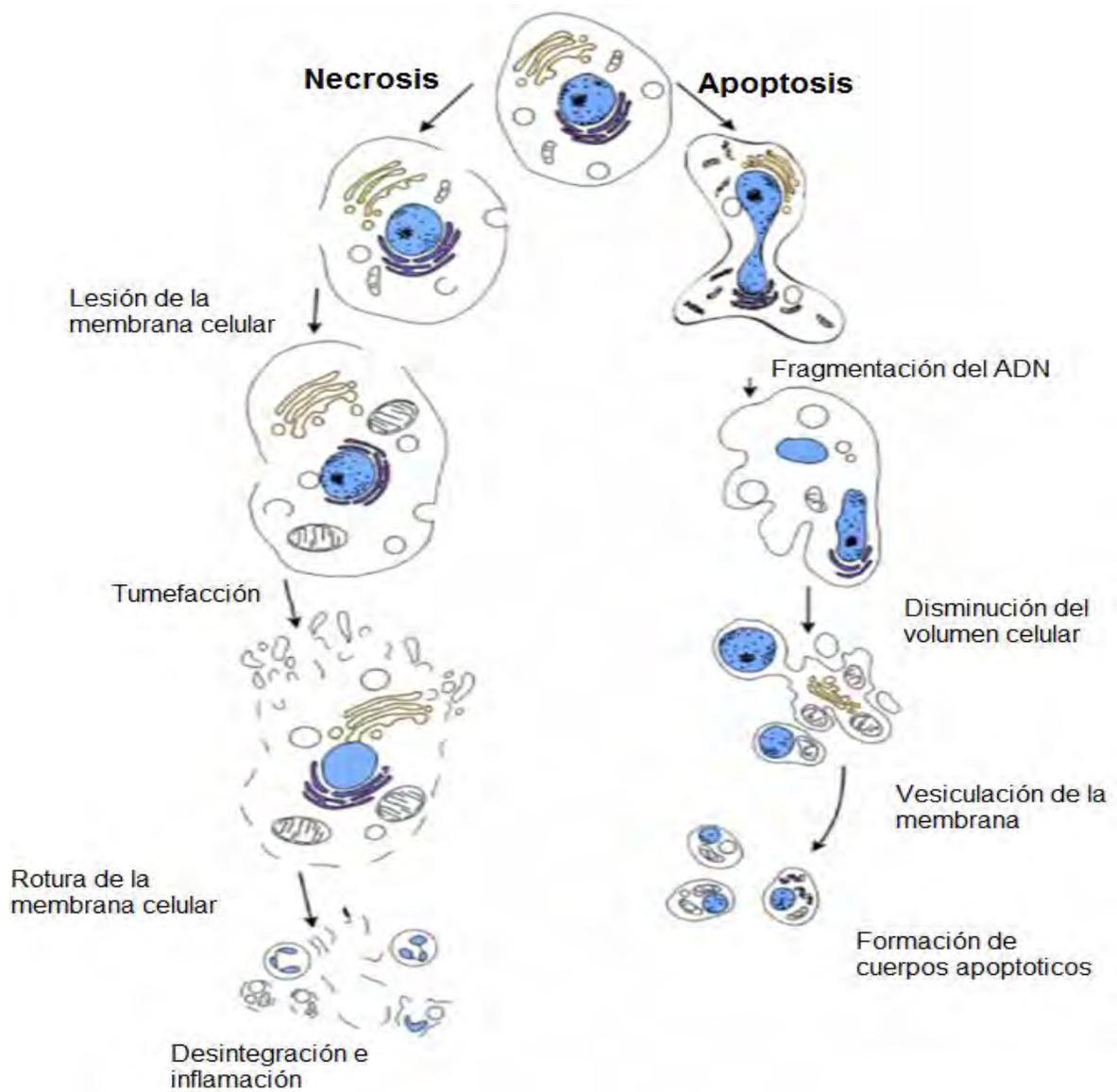


Figura 11. Diferencias entre la necrosis y apoptosis. En la necrosis se produce el daño en la célula y el rompimiento de la membrana plasmática, cuyo contenido daña a las células vecinas. La apoptosis se caracteriza por el daño a la célula, que se caracteriza por la condensación de la cromatina, la formación de cuerpos apoptóticos y fagocitosis de estos. Modificada de Roos y Wojciech, 2007.

La necrosis, es un proceso degenerativo de la célula que se produce por agentes tóxicos. Cuando las células que mueren por este proceso aumentan de volumen, se rompe la membrana plasmática, se liberan los componentes celulares al microambiente se provoca inflamación y se dañan las células vecinas (Sánchez-Torres, 2003) (Figura 11 y Cuadro 1).



Cuadro 1 Comparación de las principales características de la muerte celular: necrosis y apoptosis. Modificada de Elmore, 2007.

Características	Apoptosis	Necrosis
Número de células	Células individuales o pequeños grupos de células	Generalmente grandes cantidades
Volumen celular	Encogimiento celular	Hinchamiento celular, citólisis
Efecto en integridad de membrana plasmática	Membrana celular intacta	Membrana celular comprometida
Efecto en citoplasma	Retenido en cuerpos apoptóticos	Liberado al espacio extracelular
Efecto en núcleo	Condensación de cromatina (Picnosis)	Fragmentación del núcleo y cromatina
Procesos de inflamación tisular	No hay presencia de inflamación	Inflamación usualmente presente

### Apoptosis

Willian Councilmanen describió la apoptosis por primera vez en el año de 1890, en pacientes con fiebre amarilla, quien la describió como cuerpos acidófilos vacuolados. Más tarde, Robert Schröder en 1914, indicó que eran células endoteliales, posteriormente un grupo de investigadores la describen de manera detallada en 1965 y acuñan el término en 1972 (Sánchez-Torres, 2003).

La muerte celular por apoptosis es una muerte celular programada que se presenta en las células somáticas y en las germinales, porque el organismo requiere de la muerte de una célula en particular para su desarrollo o porque presenta un daño irreparable que no permite que la célula cumpla su función y por tanto muere. Este proceso es esencial para mantener constante el número de células en el tejido y ocurre de forma habitual a lo largo de toda la vida (Tilly, 1996; Naval y col., 2004).

Los eventos morfológicos que se producen durante la apoptosis comprenden la formación de burbujas en la membrana plasmática y disminución del volumen



celular, condensación del citoplasma, reducción del núcleo, compactación de la cromatina, agregación de los poros nucleares, desensamble de las proteínas del citoesqueleto y reducción de la función mitocondrial, disgregación de la célula y formación de los cuerpos apoptóticos que son fagocitados por los macrófagos (Brinckworth y col., 1995; Alfaro, 2000; Pentikainen, 2002; Lizarbe, 2007; Shaha y col., 2010) (Figura 12).

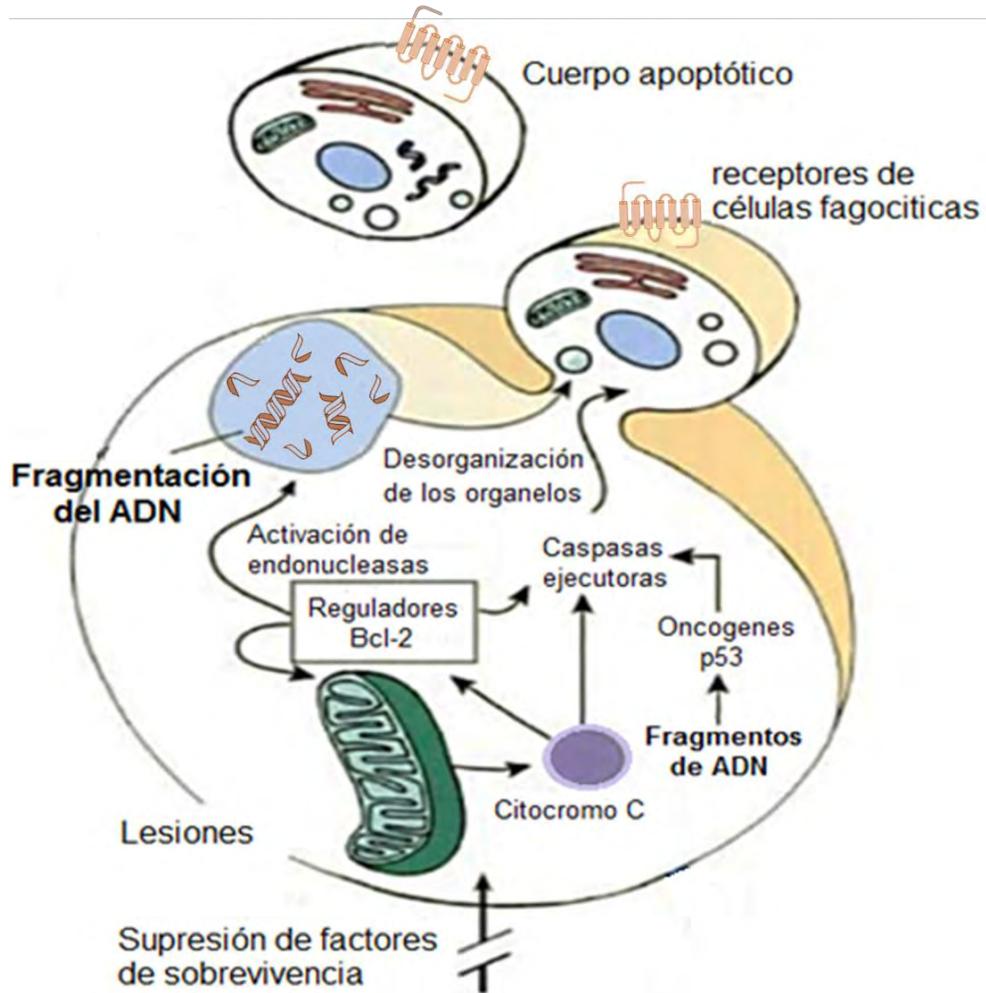


Figura. 12 Representación de los eventos que conducen a la apoptosis. Así como los cuerpos apoptóticos que expresan receptores a células fagocíticas. *Bi Cell Lymphome*, (Bcl-2), proteína p53. Modificada de Roos y Wojciech, 2007.

Además de los cambios morfológicos también se llevan a cabo bioquímicos, que incluyen la exposición de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana plasmática, la activación de cascadas de caspasas y la escisión y fragmentación del ácido desoxirribonucleico (ADN). Este último es un indicador importante de la



apoptosis y constituye un marcador para la detección de este proceso (Naval, 2004; Flores, 2005) (Figura 13).

Durante la fragmentación de ADN, la ADNasa es la enzima responsable de la fragmentación en un patrón de escalera en secciones de 180-200 pares de base o sus múltiplos, característica que se usa en diversas técnicas de marcaje en la detección de la apoptosis (Flores, 2005; Lizarbe, 2007). Como la técnica de TUNEL, que se basa en el marcaje del ADN de hebra sencilla por medio de una transferasa terminal que adiciona nucleótidos marcados en el extremo libre 3'. Dichos nucleótidos marcados se pueden identificar con fluorescencia o por inmunohistoquímica (González, 1996; Alfaro, 2000; Hussein, 2005).

La apoptosis, comprende tres etapas: inicial, de ejecución y de eliminación. Las dos vías que conducen a la apoptosis, intrínseca o mitocondrial y extrínseca o de receptor de muerte (Naval y col., 2004; Casa, 2006; Ruwanpura y col., 2010). La vía intrínseca se desencadena por señales que activan genes inductores de la apoptosis (pro-apoptóticos: Bax, Bak, Bad, Bcl-xS, Bid, Bik y Bim), e inhibidores (antiapoptóticos: Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Bfl-1 y McL-1) (Hsu y Hsueh, 1998; Coultas y col., 2003; Elmore 2007). Un exceso de actividad proapoptótica induce la liberación del citocromo c, que al unirse al factor activador de la proteasa 1 (APAF-1) y a la pro-caspasa 9 forma el complejo apoptosoma. Este complejo activa las caspasas 3 y 7 que induce la respuesta apoptótica. El núcleo de la célula se fragmenta y se forman los cuerpos apoptóticos (Jordan, 2003).

La vía extrínseca, se inicia cuando una proteína extracelular se une a su receptor, que posee en su región intracelular el dominio de muerte. Entre los receptores de muerte se encuentra la familia del receptor del factor de necrosis tumoral. La ruta inicia con la unión del ligando Fas a su receptor y su posterior unión a la proteína adaptadora de dominio de muerte asociado a FAS (FADD del inglés Fas-Associated protein with Death Domain). FADD a su vez por intermedio de su dominio DED, se une a la caspasa 8. La unión de varias moléculas de caspasa 8 a este complejo ocasiona su auto activación proteolítica. Posteriormente la caspasa 8 activa a la 3, que se encarga de ejecutar la muerte de la célula por apoptosis. Esta ruta es similar a la activada por la unión del Factor de Necrosis Tumoral (TNF) a su receptor (Kimm y col., 1999; Jordan, 2003; Naval y col., 2004; Cuello; 2006; Ruwanpura y col., 2010) (Figura 13).



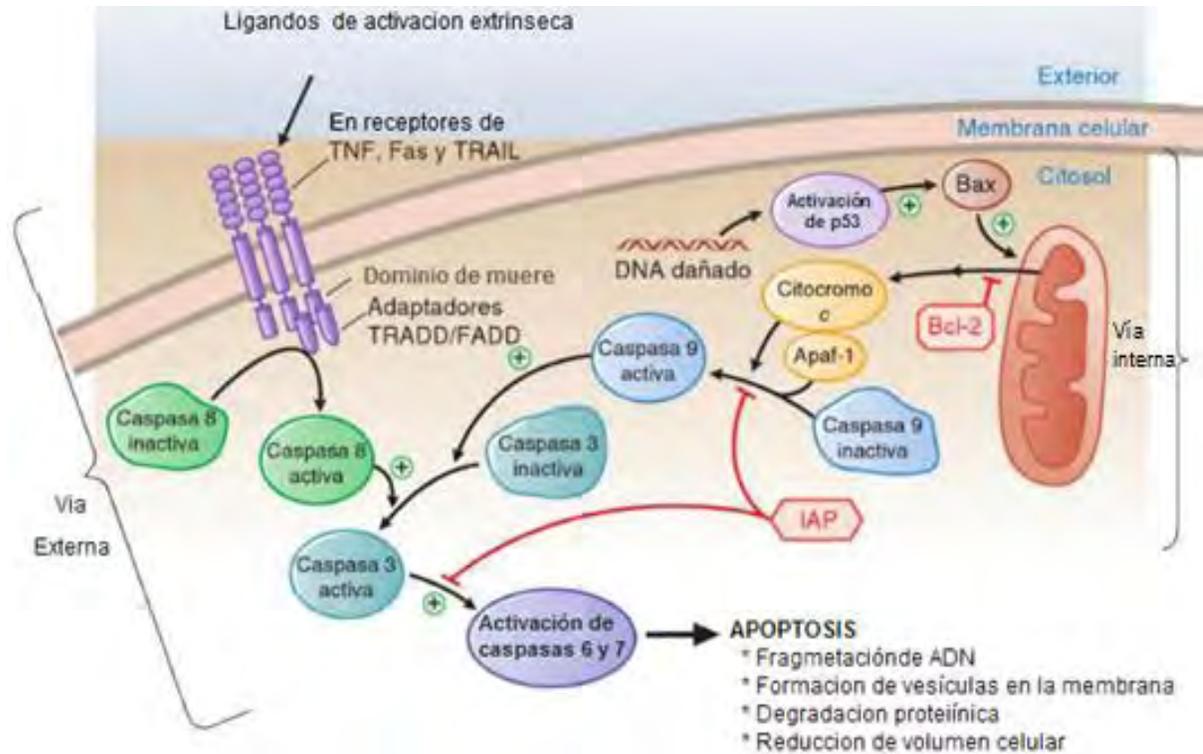


Figura. 13 Via extrínseca e intrínseca de la apoptosis. Modificada de Brunton-Laurence, 2012).

### Relación entre hormonas y apoptosis

Existen factores promotores de la muerte o supervivencia celular entre los últimos se encuentran las gonadotropinas y factores intraováricos, como los esteroides gonadales (Matsuda-Minehata y col., 2006). La LH y FSH, ambas gonadotropinas son factores de supervivencia, cuando disminuye la concentración de estas se incrementa la apoptosis (Markstrom y col., 2002; Flores, 2005; Matsuda-Minehata y col., 2012).

La hidrólisis de esfingomielina y la generación de ceramida se han implicado en una vía de transducción de señales que modula los efectos del factor de necrosis tumoral alfa (TNF-alfa) cuyo receptor contiene un dominio de muerte, induce la apoptosis debido a que activa a la enzima esfingomielinasa que degrada la esfingomielina y estimula la formación de ceramida. En células leucémicas, TNF-alfa induce la fragmentación del ADN, lo que conduce a la muerte celular programada (Obeid y col., 1993; Kolesnick y Fuks, 2003). La ceramida es un esfingolípido conservado evolutivamente en sistemas de señalización. Actúa como un segundo mensajero en la iniciación de una respuesta apoptótica mediante el sistema



mitocondrial (Kolesnick, 1991, Kolesnick y Fuks, 2003), la cual conduce a la apoptosis de las células de la granulosa (Flores, 2005).

En los folículos primordiales, el ligando kit y algunos factores de crecimiento como el epidermal (EGF) y el de fibroblástico básico (bFGF) son factores de sobrevivencia (Sánchez-Torres, 2003). En los folículos secundarios, el factor de crecimiento similar a la insulina I (IGF) y la interleucina 1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) estimulan la diferenciación de las células de la granulosa (Markstrom y col., 2002).

Los estrógenos favorecen la división de las células de la granulosa y como consecuencia estimulan el crecimiento de los folículos y disminuye la atresia (Rosenfeld y col., 2001; Britt y Findlay, 2002). Cuando disminuye la concentración de estradiol se induce la atresia folicular. Además, los estrógenos estimulan la síntesis y liberación de las gonadotropinas y como consecuencia promueven el crecimiento folicular (Chedrese, 2003; Flores, 2005; Rosales y Guzmán, 2008; Sirotkin y col., 2016). Por el contrario, los andrógenos como la testosterona actúan como promotores de la apoptosis en las células de la granulosa y atresia folicular (Billig y col., 1993; Chedrese, 2003.)

### Síntesis de hormonas esteroideas

La estructura básica de los esteroideos está compuesta por cuatro anillos fusionados A, B, C, y D, que se le llama ciclopentanoperhidrofenantreno (William y Duax, 2012) (Figura 14). En el folículo ovárico se sintetizan y secretan hormonas esteroideas, estradiol, progesterona y en menor proporción testosterona (Speroff, 1999). Este proceso es regulado por las gonadotropinas, por factores de crecimiento como el EGF, factor de crecimiento neuronal (NGF), factor de crecimiento tumoral alfa (TGF $\alpha$ ) y factor de crecimiento tumoral beta (TGF $\beta$ ), así como las aminas biogénicas, la noradrenalina y serotonina (Havelock y col., 2004; Cui y Shen, 2013).

Las hormonas esteroideas se forman a partir del colesterol cuya fuente son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o alta densidad (HDL). El ingreso de LDL a la célula es por endocitosis mediada por un receptor, donde forma éster de colesterol que se almacena y el colesterol libre se transporta a la mitocondria por la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR) (Figura 15). Otra fuente de colesterol es el que se sintetiza de novo en la misma célula a partir del Acetil- CoA (Druker, 2005; Magoffin, 2005; Hu y col., 2010).



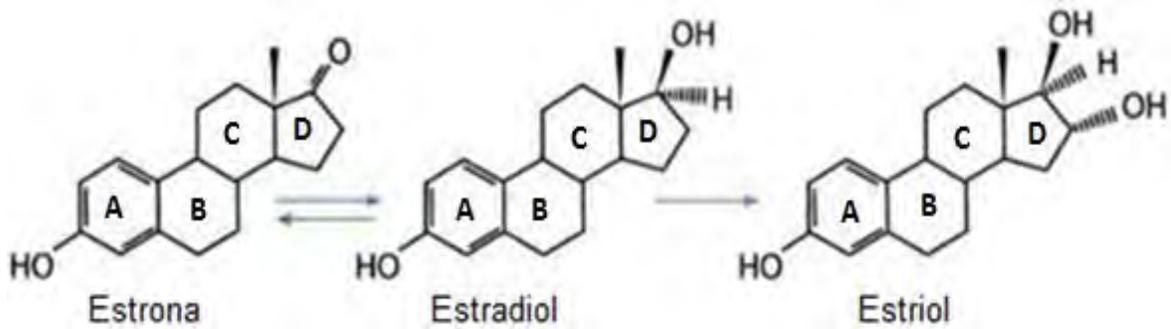


Figura. 14 Estructura química de estrona estradiol y su principal metabolito, estriol. Modificada de Mendosa, 2008.

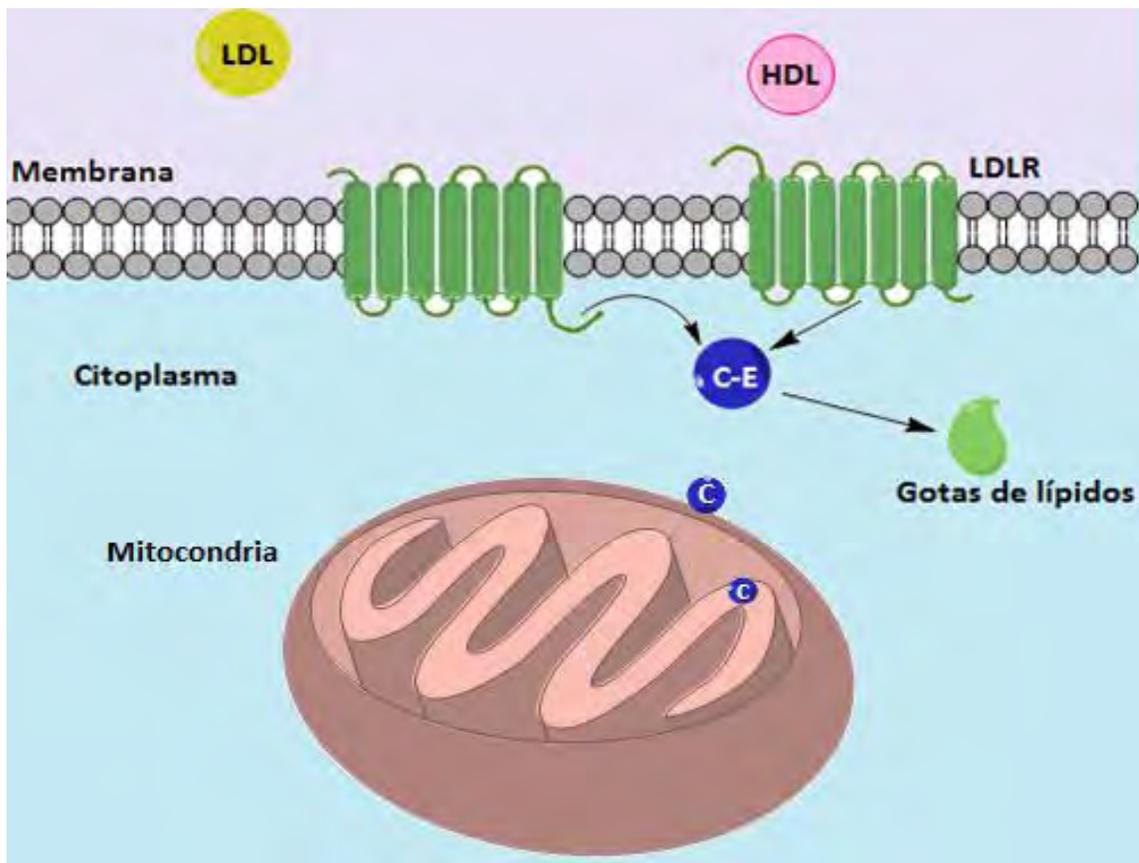


Figura. 15 Fuentes de colesterol de célula, la esterificación de este y su ingreso a la mitocondria. Lipoproteínas de alta densidad (HDL), lipoproteínas de baja densidad (LDL), Receptores a lipoproteínas de baja densidad (LDLR), colesterol-éster (C-E) y colesterol (C). Modificada de Matthew y col., 2006.

En la célula de la teca, la unión de la LH a su receptor activa a la adenilato ciclasa, enzima que cataliza la conversión de la trifosfato de adenosin (ATP) en adenosin monofosfato cíclico (AMPC) segundo mensajero que inicia una cascada

de señalización que activa la enzima desmolasa (P450scc) que transforma el colesterol a pregnenolona y la P45017 $\alpha$  que actúa en la pregnenolona para formar los andrógenos como la testosterona. Este andrógeno se difunde a la circulación general o a la célula de la granulosa en donde es aromatizado a estrógenos (Gómez-Chang y col., 2012; Díaz y col., 2014). La formación del estradiol, se produce por dos vías: la  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$  que se diferencian en las enzimas que actúan (Figura 16) (Vega, 1997; Druker, 2005; Gal y col., 2007).

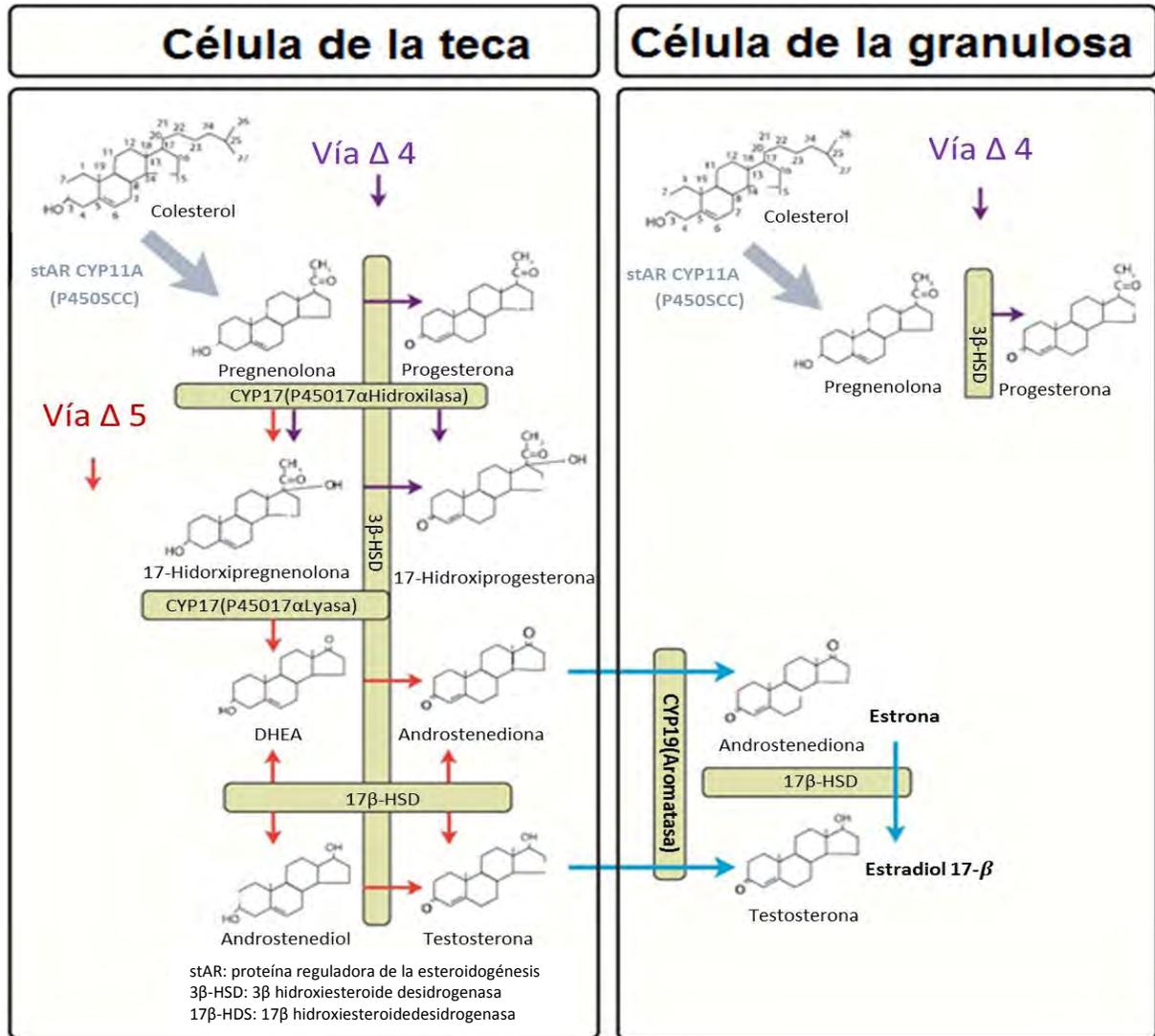


Figura. 16 Esteroidogénesis, rutas  $\Delta 5$  y  $\Delta 4$ . El punto de partida para la síntesis de estrógenos es la conversión de colesterol en pregnenolona por P450scc y culmina con la aromatización de andrógenos a estrógenos. La CYP19 (aromatasa), que convierte los andrógenos en estrógenos, se expresa en las células de la granulosa (Modificada de Leão y Esteves, 2014).



La vía  $\Delta 5$ , ocurre preferentemente en el folículo ya que las células de la teca metabolizan la 17-OH-pregnenolona que se sintetiza a partir de la pregnenolona por acción de la 17 $\alpha$ -hidroxilasa (P450c17). Posterior a ello la enzima C17-20 liasa, convierte la 17-OH- pregnenolona en dehidroepiandrostenediona (DHEA) que por acción de la hidroxid- $\Delta$ -5-esteroide deshidrogenasa (HSD3B2) se transforma en androstenediona y esta a su vez en dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona. El estrógeno que se sintetiza en esta ruta es la estrona (Figura 16) (Yen y col., 2001; Silbernagl, 2009; Young y McNeilly, 2010; Gómez-Chang y col., 2012).

La vía  $\Delta 4$ , (Figura 16) se lleva a cabo en el cuerpo lúteo, la enzima 3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3 $\beta$ HSD) transforma la pregnenolona a progesterona y la 17- $\alpha$ -hidroxilasa cataliza la biotransformación de la progesterona a 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona y posteriormente a androstenediona y finalmente se forma la testosterona, que difunde a las células de la granulosa, en donde la FSH se une a sus receptores y activa a la P450 aromatasa que transforma este andrógeno a estradiol (Yen y col., 2001; Chedrese, 2003; Silbernagl, 2009; Gómez-Chang y col., 2012).

Los estrógenos directamente en el ovario, estimulan el desarrollo folicular y la proliferación de las células granulosas. La disminución en la concentración de estrógenos en el líquido folicular se asocia con el aumento en la atresia folicular. Indirectamente estimulan la síntesis y liberación de la FSH y LH. La primera promueve el crecimiento folicular y estimulan la actividad aromatasa, que conduce a una mayor síntesis de estrógenos (Frindlay y col., 2000; Rosenfeld y col., 2001; Chedrese, 2003).

### Enzima aromatasa

La aromatasa o complejo P450Arom se expresa en las células de granulosa, cuerpo lúteo, placenta, tejido adiposo, fibroblastos de piel y cerebro (Lala, 2004). La enzima aromatiza el anillo A de la estructura ciclopentano perhidrofenantreno de la testosterona y forma el estradiol (Simpson, 2001; Simpson, 2002; Chen, 2003; Rowland, 2006 Hong, 2008)

La actividad de la enzima aromatasa depende de la etapa de desarrollo de los folículos, en los preovulatorios es activa en comparación con las etapas previas del desarrollo del folículo. En cuanto al estado del folículo, también cambia su actividad, en los atrésicos es baja y en los sanos se incrementa (Tsonis y col., 1984; Chedrese, 2003; Casper, 2006; zhao y col., 20014).



## Serotonina

La serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) fue identificada en 1937 en las células enterocromafines del intestino posteriormente en 1948 a partir del suero de vaca fue aislada, purificada e identificada como serotonina (Rang y col., 2004). Es una amina biogénica que tiene un peso molecular de 176 Daltons. Se caracteriza por la presencia del grupo hidroxilo en la posición 5 del núcleo indol y una amida nitrogenada primaria (Figura 18) que acepta un protón a pH fisiológico, y es un neurotransmisor en el sistema nervioso central. Esta molécula no atraviesa la barrera hematoencefálica (Jacobs y Azmitia, 1992; Kronenberg, 2009; Hornun, 2010; Celada y col., 2013).

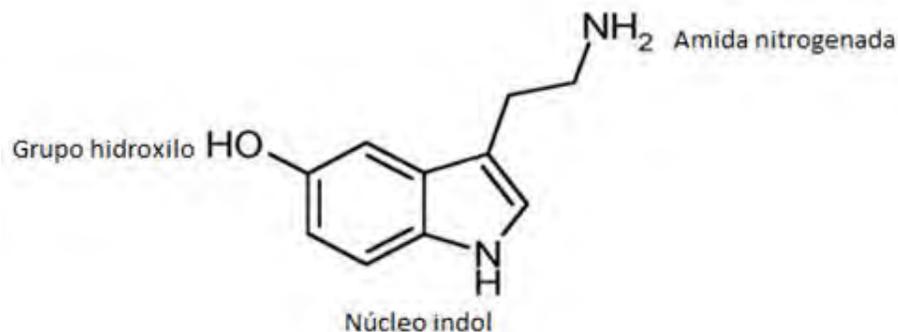


Figura. 18 Estructura química de la serotonina. Modificada de Lorenzo y Lizasoain, 2003.

El 95% de la serotonina se sintetiza en las células enterocromafines del sistema gastrointestinal y el resto se produce en las neuronas serotoninérgicas del SNC y la glándula pineal (Tinajero y col., 1993; Trueta y Cercós, 2012). También se encuentra en órganos reproductivos como el ovario y el testículo (Dubé y Amireault, 2007).

El número de neuronas que comprenden al sistema serotoninérgico es pequeño, comparado con el total de neuronas en el SNC y están organizadas en nueve paquetes celulares que van del B1 al B9 (Figura 19). Estos conjuntamente se denomina el núcleo del rafé, que se divide en dorsal (NDR), medial (NMR) y del puente (NPR). Las fibras serotoninérgicas envían proyecciones a la corteza cerebral, el hipocampo, la hipófisis, la amígdala cerebral, los ganglios basales, el hipotálamo, el cerebelo, el puente y la médula espinal (Jacobs y Azmitia, 1992; Jorgensen, 2007; Hornun, 2010).

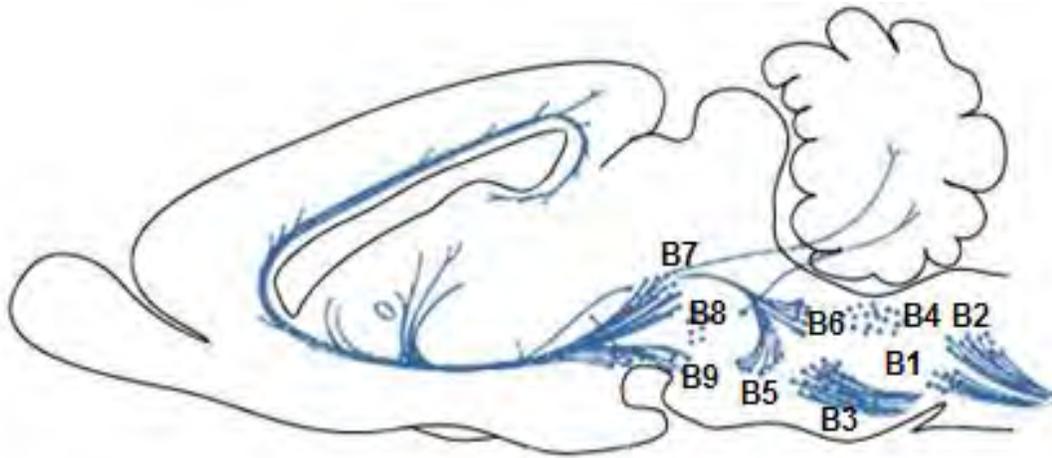


Figura. 19 Esquema representativo del sistema serotoninérgico en el cerebro de la rata y los núcleos que sintetizan esta amina. Modificada de Jorgensen, 2007.

La serotonina también está presente en las paredes de los vasos sanguíneos, en las plaquetas, los pulmones, el corazón y en las gónadas (Jacobs y Azmitia, 1992; Aghajanian y Sander-Bush, 2002; Rang y col., 2004; Matthew y col., 2006; Jorgensen, 2007; Mohammad-Zadeh y col., 2008). Sin embargo, no todas las células que contienen serotonina la sintetizan, este es el caso de las plaquetas que la obtienen del plasma por un mecanismo de transporte activo que se encuentra en la membrana plaquetaria y la almacenan (Kronenberg, 2009; Mercado y Kilic, 2013; Lingjaerde, 2013). En el ovario, las células de la granulosa sintetizan serotonina y otras fuentes de la amina son los mastocitos y las plaquetas (Dubé y Amireaul, 2007; Mercado, 2010).

La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido triptófano que se obtiene de la dieta. Del 80-90 del aminoácido que ingresa a la circulación sanguínea se une a la albúmina y el resto circular libremente, se transporta al cerebro ingresa a la neurona o a la célula que la sintetiza (Kruk y Pycocock, 1991; Jorgensen, 2007; Kronenberg, 2009; Welford y col., 2016). El triptófano es hidroxilado por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) y forma el 5-hidroxitriptófano (5-HTP) que por acción de la enzima 5-hidroxitriptófano descarboxilasa forma la serotonina (Mohammad-Zadeh y col., 2008; Azmitia, 2010; Best y col., 2010; Lullmann y col., 2010; Glennon y Dukat, 2012; Welford y col., 2016) (Figura 20). Se han identificado dos isoformas de la TPH, la uno que se encuentra en la glándula pineal y tejidos periféricos y la TPH-2 que se encuentra en el cerebro (Mohammad-Zadeh y col., 2008; Azmitia, 2010).

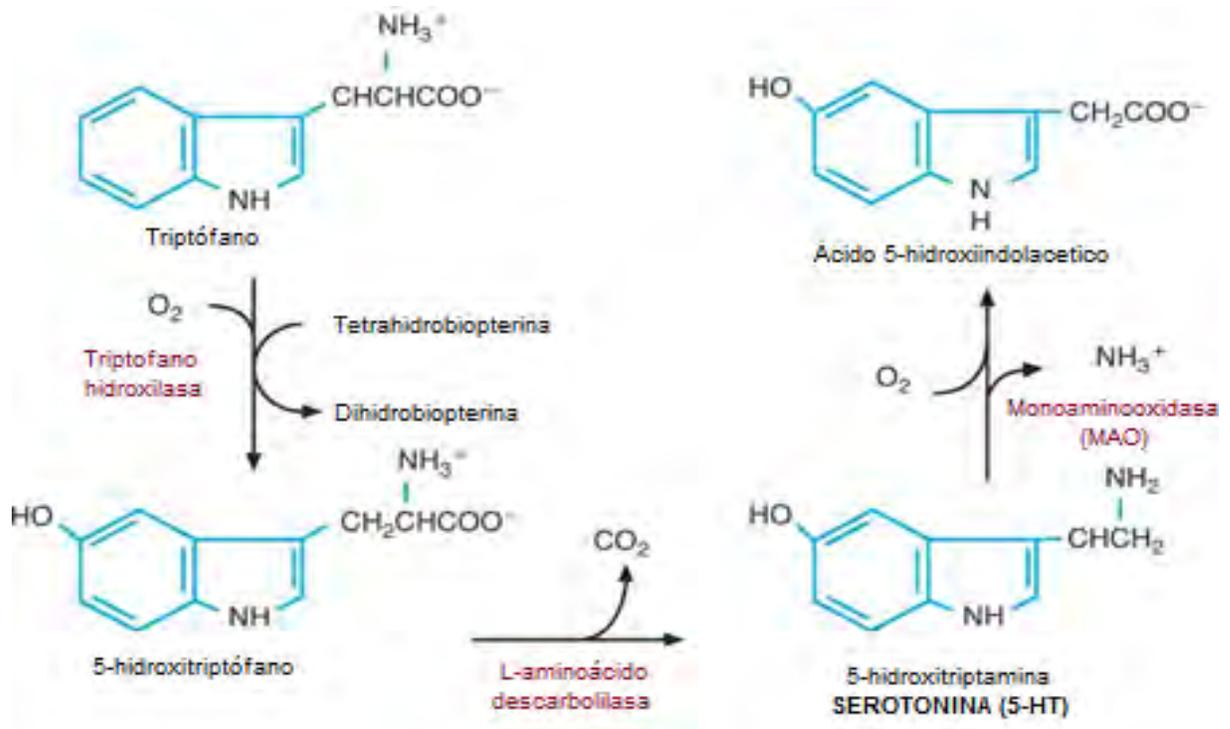


Figura. 20 Síntesis de serotonina a partir de triptófano y metabolismo al ácido 5 hidroxiindolacético. Monoamino oxidasa (MAO) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). Modificada de Nussey y Whitehead, 2001.

La serotonina se almacena en vesículas y su liberación por exocitosis es favorecida por la entrada de  $Ca^{2+}$  a la terminal de la neurona presináptica. La 5-HT se une a su receptor de membrana localizado en la célula postsináptica, la amina que queda libre se une a una proteína transportadora (SERT) y es transportada a la terminal presináptica donde es recapturada y desaminada por la enzima monoaminoxidasa (MAO) a 5-hidroxiindolacetaldehído (Jacobs y Azmitia, 1992; Nichols y Nichols, 2008; Azmitia, 2010). Este metabolito se elimina por los plexos coroideos y las células parenquimales cerebrales (Jorgensen, 2007; Lingjaerde, 2013). La recaptura de 5-HT es esencial en la inactivación de la 5-HT (Vera, 2005). En consecuencia reduce la disponibilidad de la amina y finaliza la neurotransmisión serotoninérgica (Siegel y col., 1999) (Figura 21).

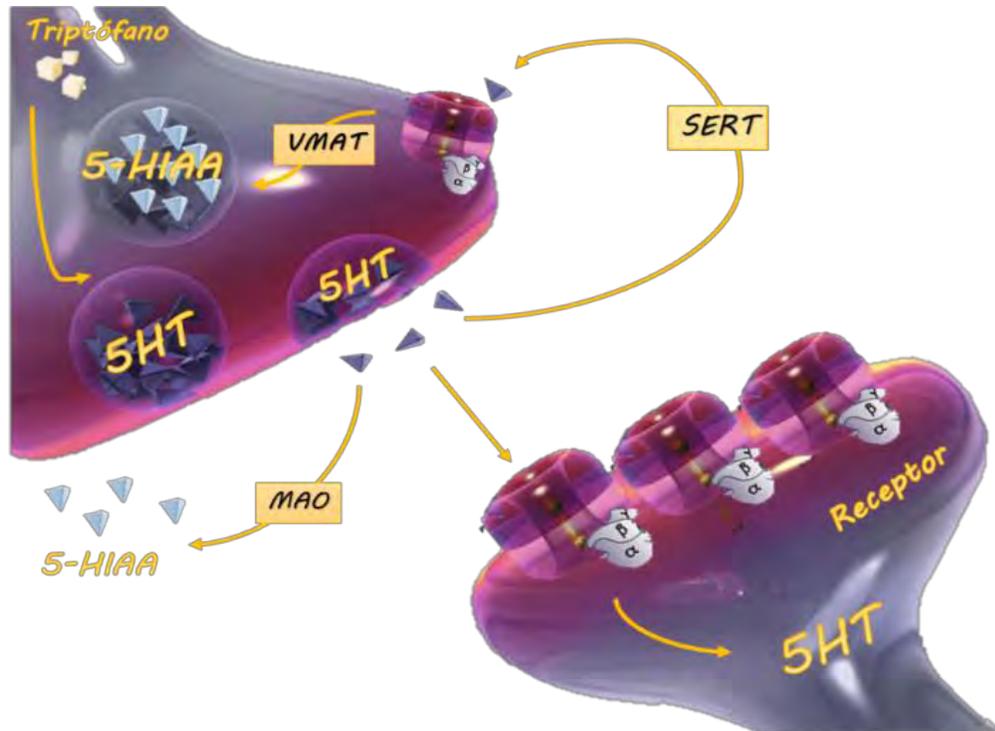


Figura. 21 Vías del metabolismo de serotonina. Transportador vesicular de monoamina (VMAT), ácido 5 hidroxindolacético (5-HIAA), serotonina (5-HT), transportador de serotonina (SERT), monoaminoxidasa (MAO), subunidades del receptor ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Modificada de <http://ac-biologia.blogspot.mx/2013/08/proceso-de-sinapsis-y-neurotransmisores.html>.

Las funciones que la serotonina ejerce dependen de su unión a sus receptores de membrana. Se han identificado siete miembros (5-HT<sub>1</sub> a 5-HT<sub>7</sub>) y tienen varios subtipos (5-HT<sub>1A</sub> a 5-HT<sub>1F</sub>) (Hoyer y Martin, 1997; Dubé y Amirrealult, 2007; Linder y col., 2007; Ira, 2011) (Cuadro 2).

Cuadro 2. Marcadores del sistema serotoninérgico en mamíferos-(Modificado de Dubé Amirreault, 2007).

Componente del sistema serotoninérgico	Especie	Células y tejidos	Referencia
5-HT	Humano	Fluido folicular	Sosa y col., 1988; Bodis y col., 1992; Bodis y col., 1993.
	Rata	Ovario, útero, oviductos y placenta	Clausell y Soliman, 1978; McKercher y col., 1973; Acharya y col., 1989; Juorio y col., 1989; Amenta y col., 1992.
	Ratón	Ovocito, células del cumulus y embriones	Amirreault y Dubé, 2005a; Il'kova y col., 2004.
Receptor 5-HT			
5-HT <sub>7</sub>	Humano	Células de la granulosa	Graveleau y col., 2000.
	Ratón	Ovocito, células del cumulus y embriones	Amirreault y Dubé, 2005b.
5-HT <sub>1D</sub>	Ratón	Ovocito y embriones	Vesela y col., 2003 Il'kova y col., 2004.
5-HT <sub>2A</sub>	Humano	Ovocito	Neilson y col., 2000.
	Ratón	Células del cumulus	Amirreault y Dubé, 2005b.
5-HT <sub>2B</sub>	Ratón	Células del cumulus	Amirreault y Dubé, 2005b.
5-HT <sub>5A</sub>	Ratón	Ovocito	Hinckey y col., 2005.
Triptófano hidroxilasa-1 (TPH1)	Ratón	Células del cumulus	Amirreault y Dubé, 2005a
Proteína transportadora de serotonina (SERT)	Ratón Hámster	Ovocito, células del cumulus y embriones	Amirreault y Dubé, 2005a



Los receptores a serotonina están acoplados a proteínas G heterodiméricas (GPCR), con siete dominios transmembranales, a excepción del 5-HT<sub>3</sub> que une a un receptor acoplado a un canal iónico regulado por ligando (Rang y col., 2004; Jorgensen, 2007; Lullmann y col., 2010).

Los receptores a serotonina se encuentran en el SNC y tejidos periféricos como el intestino, vasos sanguíneos, plaquetas y en las gónadas (Heidmann y col., 1997; Hagan y col., 2000; Vecelá y col., 2003; Dubé y Amirreault, 2007; Irving y col., 2007; Jorgensen, 2007; Nichols y Nichols, 2008; Lullmann y col., 2010; Mendog y col., 2010). La unión de la amina a sus receptores se asocia con la regulación de diversas funciones como estados de ánimo, contracción muscular, sueño y memoria entre otros.

### Receptor 5-HT<sub>7</sub>

En el SNC, la unión de serotonina a su receptor 5-HT<sub>7</sub> se asocia con la regulación de procesos como el aprendizaje, la memoria, secreción de factores hipotalámicos y de hormonas por la hipófisis (Jorgensen, 2007). Se encuentra implicado con trastornos neurológicos, como la depresión y esquizofrenia, ansiedad, epilepsia y pánico (Hedlund, 2009). *In vitro* regula la secreción pulsátil de la GnRH (Héry y col., 1997; Wada y col., 2006) y de esteroides por las células de la granulosa luteinizadas (Graveleau y col. 2000).

El receptor 5-HT<sub>7</sub> está acoplado a proteína G, aumenta la actividad del AMPc y activa los microtúbulos asociados a proteínas (MAP) cinasas. Está formado por 445 aminoácidos y hasta el momento se han descrito cuatro isoformas del receptor que van del 5-HT<sub>7A</sub> al 5-HT<sub>7D</sub> aunque farmacológicamente son similares, la diferencia entre estos es el extremo C-terminal (Heidmann, 1997; Pytliak y col., 2011; Meneses, 2014).

El receptor a serotonina 5-HT<sub>7</sub> se ha identificado en corazón, glándulas mamarias, intestino delgado, colon, vasos sanguíneos periféricos, en el músculo liso, el ovario, médula espinal y el cerebro (Ruat y col., 1993; Ullmer y col., 1995; Heidman y col., 1997; Graveleau y col., 2000; Irving y col., 2007; Nichols y Nichols, 2008; Sánchez-López y col., 2009; Pytliak y col., 2011; Cuesta y col., 2014; Pai y col., 2104). En el cerebro, el receptor se encuentra en el tálamo anterior, hipocampo, hipotálamo, septum, en el cíngulo anterior, algunos núcleos de la amígdala y del tronco





cerebral, en los ganglios basales y el núcleo del rafé (Hagan y col., 2000; Gravelleau y col., 2000; Irving y col., 2007; Nichols y Nichols, 2008; Sánchez-López y col., 2009; Mendog y col., 2010). En el ovario se le identifica en el ovocito (Amieraul y Dubé, 2007) y en las células de la granulosa (Gravelleau y col., 2000).

### Serotonina, funciones y eje hipotálamo-hipófisis-ovario

La serotonina se encuentra en los tres componentes del eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-ovario, en donde modula la secreción de GnRH, gonadotropinas y de esteroides, respectivamente, así como la ovulación (Vitale y Chiocchio, 1993; Ayala y col., 1994; Maekawa y col., 1999; Sleight col., 1995; Gravelleau y col., 2000; Moguilevsky y Wuttke, 2001; Monroy y col., 2003; Wada y col., 2005; Ayala, 2009; Moran y col., 2013).

Las fibras serotoninérgicas que se originan en los núcleos dorsal y medial del rafé hacen sinapsis en la eminencia media con las terminales de las neuronas que liberan la GnRH (Smith y Jennes, 2000) tal evidencia sustenta que la serotonina regula de la liberación de la GnRH hacia el sistema portal hipotalámico hipofisario y como consecuencia la secreción de las gonadotropinas. En la línea inmortalizada de neuronas GnRHérgicas GTI-1 se identificó el RNAm del receptor 5-HT<sub>7</sub> (Héry y col., 1997) y en la GTI-7 estimula la secreción pulsátil de la GnRH (Wada y col., 2005). Conjuntamente tales evidencias sustentan que la serotonina regula la secreción de la GnRH vía la unión a sus receptores 5-HT<sub>7</sub>.

En la rata hembra prepúber, de 30 días de edad, la lesión térmica o química del NDR, disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo y bloquea la ovulación (Ayala y col., 1994; Monroy y col., 2003). Efectos similares se observan en la rata hembra adulta con lesión térmica del NDR (Maekawa y col., 1999). Esto llevó a los autores a proponer que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé es esencial en la modulación de la ovulación.

La serotonina modula la secreción de las gonadotropinas por la hipófisis. Cuando a la rata hembra prepúber de 30 días de edad se le administra por vía sistémica el precursor de la serotonina, el 5-hidroxitriptófano, la concentración de serotonina en el hipotálamo se incrementa y se acompaña de una mayor concentración de LH, sin que se modifique la de FSH (Justo y col., 1989; Moguilevsky y Wuttke, 2001).



Se ha propuesto que la serotonina actúa directamente en el ovario modulando la ovulación (Moran y col., 2013; Romero y col., 2016) y la esteroidogénesis (Battista y Condon, 1986; Bodis, 1992; Tanaka y col., 1993; Moran y col., 2013; Romero y col., 2016). En la rata hembra de 30 días de edad se administra serotonina por vía sistémica o en la bursa del ovario, la concentración sérica de estradiol disminuye (Móran y col., 2012). Con base en estos resultados se propone que en el ovario de la rata prepúber, la serotonina ejerce un efecto inhibitorio en la secreción de estradiol. La posibilidad de que la serotonina actúe directamente en el ovario modulando sus funciones se apoya en las evidencias que muestran la presencia de marcadores del sistema serotoninérgico en el ovario de ratón: 1) en células de la granulosa, el transportador de serotonina (SERT), los receptores 5-HT<sub>7</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y en el ovocito el transportador SERT y los receptores 5-HT<sub>7</sub> y 5-HT<sub>1D</sub> (Dubé y Amireault, 2007; Henriksen y col., 2012).

La serotonina en la rata hembra prepúber de 30 días de edad participa diferencialmente en la regulación del eje, hipotálamo-hipófisis-ovario. En el hipotálamo e hipófisis es esencial en la regulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, mientras que en el ovario ejerce un efecto inhibitorio en la secreción de estradiol (Tanaka, 1993; Monroy y col., 2003; Moran y col., 2013; García, 2014).

### Anfetaminas

Las anfetaminas fueron sintetizadas por primera vez en 1887 por Lazar Edelano, posteriormente en 1920 se descubrió que el compuesto original, el sulfato de anfetamina (Figura 22) y su dextroisómero que es aún más activo, poseen la capacidad de estimular el SNC y SNP (Robledo, 2008). La efedrina, fue comercializada y se utilizó como una alternativa para tratar el asma, en 1933 se describió los efectos psicoestimulantes de las anfetaminas convirtiéndolas en una de las drogas más populares e impulso el descubrimiento de otros isómeros (Utrilla, 2000; Sulzer y col., 2005; Asser y Taba, 2015).

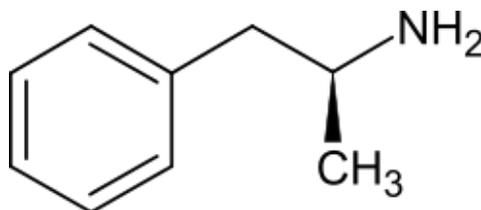


Figura. 22 Estructura química del sulfato de dextroanfetamina o anfetamina, compuesto identificado y resintetizado. Modificado de William, 2009.

Después de su descubrimiento, las anfetaminas fueron usadas para el tratamiento de la epilepsia, congestión nasal, asma, esquizofrenia, depresión, narcolepsia, mareos, obesidad, en el déficit de atención. En la segunda guerra mundial se utilizó para mantener a los soldados alertas y en vigilia o con fines recreativos (Martínez, 2002; Lorenzo, 2003; Levinthal, 2013; Hollander, 2015;). Durante la época de los 50 y 60 expandió la comercialización de las anfetaminas o sus derivados, se reportaron por primera vez los efectos nocivos y la dependencia del consumo. En 1971, las anfetaminas fueron clasificadas como drogas o sustancias psicotrópicas (Levinthal, 2013; Asser y Taba, 2015).

En 1970, se mostró el efecto estimulante de la dexedrina, debido a que favorecía la agudeza mental e incrementaba la capacidad física para el trabajo (Scott y col., 2007; Berger y col., 2009). Actualmente las anfetaminas se siguen utilizando como fármacos en el tratamiento del trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH), en el control de peso y la narcolepsia. Además son ampliamente usadas como drogas recreativas (Lorenzo y Lizasoain, 2003; Schatzberg y Nemeroff, 2006; Castellanos y Acosta, 2011).

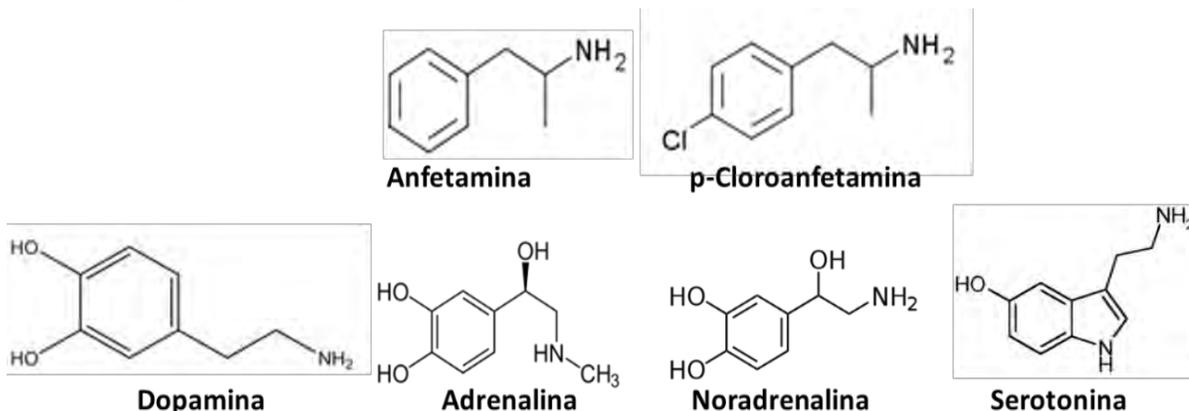


Figura. 23 Estructura química de las anfetaminas y algunos neurotransmisores. Modificada de Lorenzo y Lizasoain, 2003; William, 2009; [www.nature.com](http://www.nature.com) y [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).

Las anfetaminas tienen analogía estructural con los neurotransmisores, como la dopamina (DA), la serotonina, adrenalina (A) y noradrenalina (NA) (Figura 23) (Utrillas, 2000; Alexander y col., 2005; Sulzer y col., 2005; Scott y col., 2007; Hollander, 2015). Son liposolubles y se distribuyen en todo el cuerpo independientemente de la vía de administración, además actúan en el SNC ya que atraviesan las membranas celulares y la barrera hematoencefálica (De Souza y Battaglia, 1989; Utrilla, 2000). Dentro de la denominación anfetaminas se incluyen aquellas sustancias derivadas

de la estructura de fenilisopropilamina. A corto plazo inducen la liberación en el espacio sináptico de NA, A, DA y 5-HT desde las vesículas presinápticas y aumentan la concentración de los neurotransmisores, también bloquean la actividad de las enzimas que inactivan y degradan del neurotransmisor, como la MAO (Alles, 1932; Manzana y col., 2001; Norgahl y col., 2003; Sulzer y col., 2005). Además inhibe la recaptura del neurotransmisor e induce la producción de especies reactivas de oxígeno y nitrógeno amplificando aún más sus propiedades tóxicas (Utrillas, 2000; Fernández- Espejo, 2006; Hollander, 2015) (Figura 24).

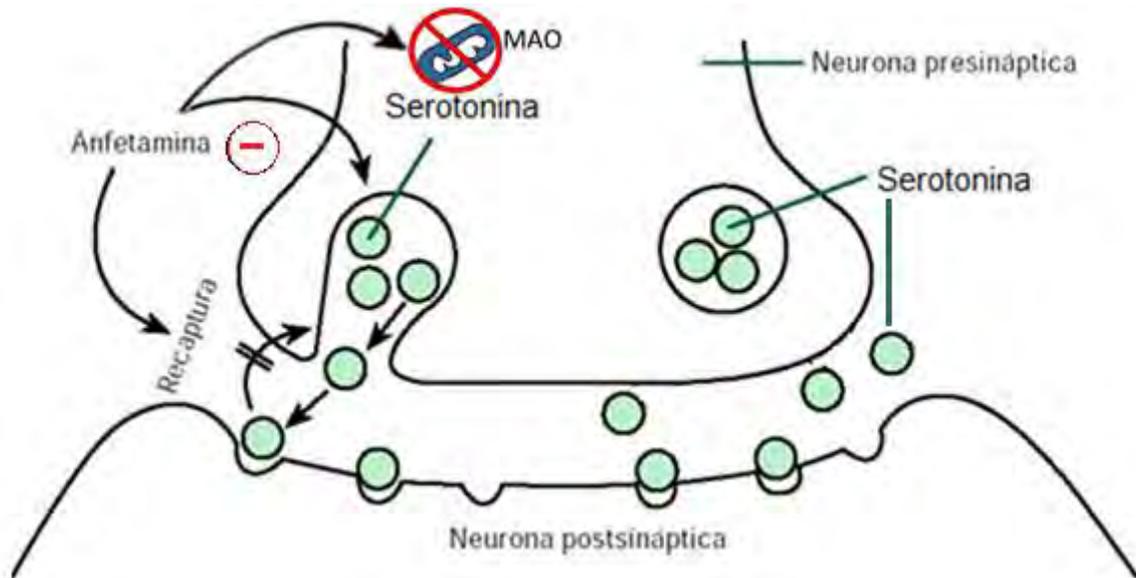


Figura. 24 Mecanismo general de acción a largo plazo de las anfetaminas en las terminal sináptica. Inhibición (-). Modificada de Robledo, 2008.

Las principales drogas de diseño comprenden los derivados de las anfetaminas (Utrilla, 2000; Lorenzo, 2003). El éxtasis o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), metilendioxianfetamina (MDA), metilendioxietilanfetamina (MDE), efedrina, pseudoefedrina, metanfetamina, metoxianfetamina, dimetoxianfetamina, metoximetanfetamina, trimetoxianfetamina y p-Cloroanfetamina (PCA) (Utrilla, 2000; Callado, 2001; Nordahl y col., 2003; Alexander y col., 2005; Farre y col., 2006) (Figura 25).

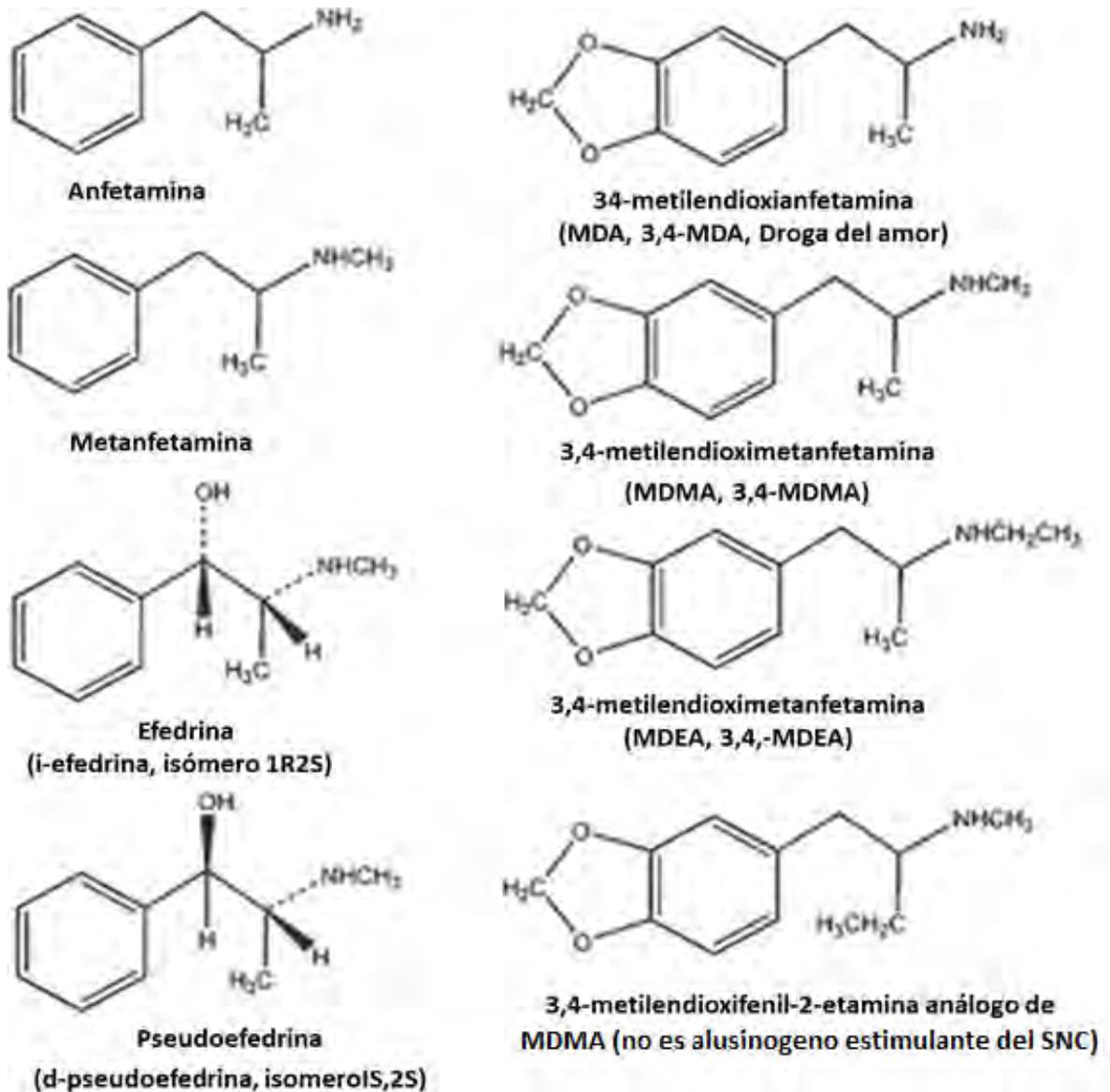


Figura. 25 Estructura química de los derivados de las anfetaminas. Modificada de Robledo, 2008.

### p-Cloroanfetamina

La p-Cloroanfetamina (pCA) inhibe al sistema serotoninérgico selectivamente (Sprague y col., 1996; Barenys y col., 2010) (Figura 26). A corto plazo induce la liberación de serotonina en la neurona presináptica, posteriormente bloquea la recaptura de serotonina, inhibe a la enzima limitante en la síntesis de la amina, la triptófano hidroxilasa (TPH) y a la monoamino oxidasa (MAO), eventos que se acompañan de una menor concentración de serotonina y del 5-HIAA en la terminal sináptica. A largo plazo induce degeneración de las terminales serotoninérgicas que inervan el cerebro (Sanders-Bush E., 1975; Ray, 1992; Sprague, 1996; García-Osta,

2000; Utrilla 2000, Manzana y col., 2001; Lorenzo, 2003; Collado, 2008; Moore y col., 2015). En el modelo de la rata, cuando se administran 10 mg/ kg de peso corporal de pCA, aumenta la concentración extracelular de serotonina dentro de las primeras 24 horas, posteriormente la concentración de serotonina en el cerebro disminuye y este efecto se mantiene hasta por 10 días (Sanders-Bush E., 1975; García-Ostra y col., 2000; Scott y col., 2007; Berger y col., 2009).

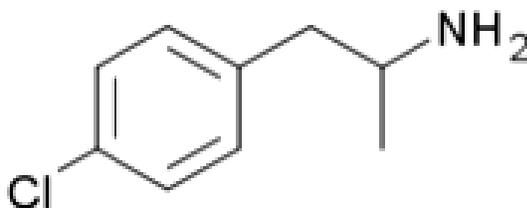


Figura. 26 Estructura química de la p-Cloroanfetamina. Modificada de [www.nature.com](http://www.nature.com) y [www.sigmaaldrich.com](http://www.sigmaaldrich.com).

Actualmente se han estudiado ampliamente los efectos de las anfetaminas y sus derivados en los sistemas de neurotransmisión en diferentes regiones del cerebro. Sin embargo, son escasos los estudios que evalúan los efectos de tales sustancias en aspectos reproductivos de la hembra, como las funciones del ovario. Cuando en la rata hembra prepúber se administra pCA por vía sistémica, disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo, se incrementa la atresia en el ovario y disminuye la concentración de estradiol en el suero (Azcona y col., 2013). Estos resultados permiten sugerir que el sistema serotoninérgico del hipotálamo es esencial en el mantenimiento de la estructura del ovario y en la modulación de la esteroidogénesis.

## Justificación

---

La serotonina se le encuentra en el ovario en donde modula la esteroidogénesis vía la unión a sus receptores, entre los que se encuentra el 5-HT<sub>7</sub>. El principal estrógeno producido por el ovario, el estradiol se forma a partir de testosterona por acción de la enzima aromatasa. Este esteroide actúa como un factor de sobrevivencia de las células foliculares. Cuando el precursor, 5-hidroxitriptofano se administra por vía sistémica o directamente en la bursa del ovario se incrementa la síntesis de serotonina en la gónada. Aunado a esto se ha mostrado que cuando se inyecta la p-Cloroanfetamina, inhibidor de la síntesis de serotonina, disminuye la secreción de estradiol e incrementa la atresia en el folículo ovárico. Sin embargo, se desconoce si estos efectos se asocian con el incremento en la apoptosis en el folículo. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de p-Cloroanfetamina en la concentración de estradiol en el suero, el desarrollo y apoptosis en el folículo, así como la distribución de la enzima aromatasa y el receptor 5-HT<sub>7</sub>.



## Hipótesis

---

La serotonina participa en la modulación de la secreción de estradiol, esencial en el desarrollo folicular. Por ello, la inhibición del sistema serotoninérgico, disminuirá la concentración de estradiol e incrementará la apoptosis en las células de la granulosa. Eventos que posiblemente se asocien con modificaciones en la distribución de la enzima aromatasa y del receptor 5-HT<sub>7</sub>.



## Objetivo general

---

**E**studiar en la rata prepúber el efecto de la inhibición del sistema serotoninérgico por la administración de p-Cloroanfetamina, en la concentración de estradiol, en el desarrollo y apoptosis del folículo, así como en la presencia de la enzima aromatasa y del receptor a serotonina 5-HT<sub>7</sub>.

## Objetivos particulares

---

- ✚ Evaluar los efectos de la Inhibición del sistema serotoninérgico en la apoptosis en el folículo ovárico de la rata prepúber.
- ✚ Estudiar los efectos de la Inhibición del sistema serotoninérgico en la concentración del estradiol en el suero de la rata prepúber.
- ✚ Analizar la distribución de la enzima aromatasa en el folículo ovárico de la rata prepúber con inhibición del sistema serotoninérgico.
- ✚ Identificar la presencia del receptor de serotonina 5-HT<sub>7</sub> en el folículo ovárico de la rata prepúber con inhibición del sistema serotoninérgico.

## Materiales y método

---

### Animales

Se utilizaron ratas hembras de 30 días de edad de la sepa CII-ZV, mantenidas en condiciones controladas de iluminación, 14 horas luz-10 h oscuridad, con libre acceso al agua y al alimento (Purina S.A., México). Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales:

### Grupos experimentales

- a) Grupo testigo absoluto (TA), 10 ratas a las cuales no se les realizó ningún tipo de tratamiento.
- b) Grupo vehículo (VH) 10 ratas a las cuales se les administró solución salina al 0.9% por vía intraperitoneal.
- c) Grupo tratado con p-Cloroanfetamina (pCA) (Sigma Chemical, St Louis, USA) 10 ratas a las cuales se les administró 10 mg/kg de peso corporal de p-Cloroanfetamina disuelta en solución salina al 0.9% por vía intraperitoneal.

### Administración de pCA o de solución salina

El tratamiento de los animales se realizó entre las 9:00 y 9:30 horas, se seleccionó este horario para el tratamiento debido a que se reporta que es en el transcurso de la mañana donde hay una mayor actividad de la TPH (Barassin y col., 2002). La dosis de pCA administrada se basó en lo reportado en bibliografía que disminuye la concentración de serotonina en el cerebro (Sanders-Bush y col., 1975). Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados 120 horas posteriores al tratamiento.

### Procedimiento de autopsia

Cinco animales de los diferentes grupos se sacrificaron por perfusión. Los animales se pesaron, anestesiaron con pentobarbital (Anestosal, Smith Kline Norden de México, México) (40 mg/kg) por vía intraperitoneal y se utilizó éter como anestesia complementaria cuando fue necesario. Se procedió a realizar la perfusión. Para ello, se introdujo en el ventrículo izquierdo una aguja calibre 15 acoplada a una bomba de perfusión (Flujo medio/alto, modelo 3389, Control company, USA), inicialmente se perfundió solución salina al 0.9 % y posteriormente el fijador, paraformaldehído al

4 % (Sigma Chemical, St Louis, USA) (Figura 27). Concluida la perfusión, se realizó la disección de los ovarios, que se postfijaron con paraformaldehído, 4 horas posteriormente se colocaron en sacarosa (Sigma Chemical, St Louis, USA) al 15 %, por 24 horas la que se eliminó con alcohol 70% y posteriormente se procesaron para su inclusión en paraplast (Mc Cormick Scientific USA) durante 2 horas.

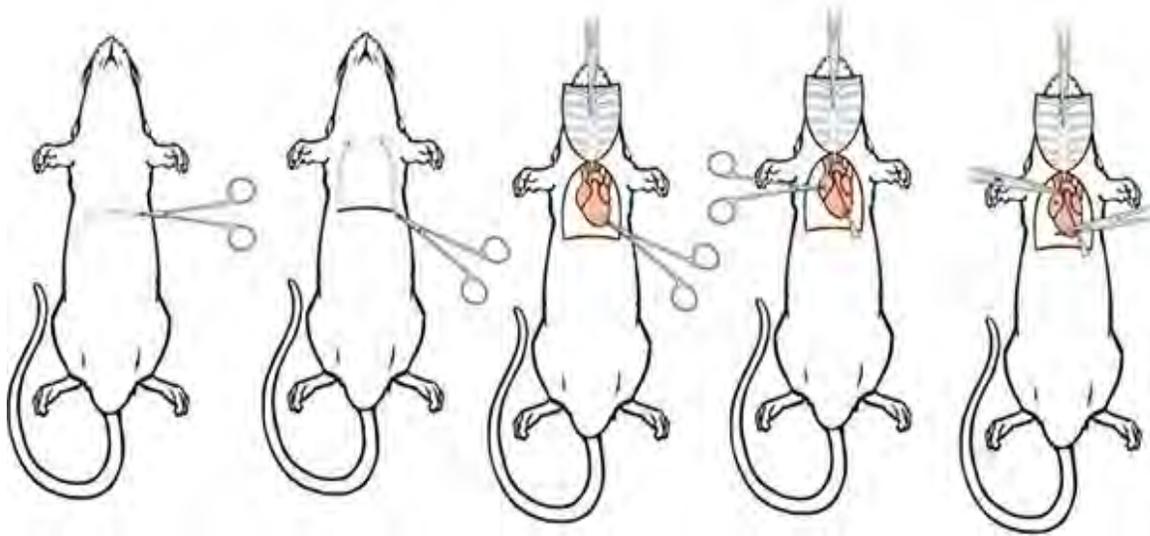


Figura. 27 Fijado de los tejidos de la rata por perfusión.  
<http://www.jove.com/video/3564/animal-entero-fijacin-por-perfusin-de-los-roedores?language=Spanish>.

Siete animales de los diferentes grupos se sacrificaron por decapitación. Se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y se separó el suero, el que se almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  para la posterior cuantificación de  $17\beta$ -estradiol por radioinmunoanálisis.

### **Deshidratación, inclusión y cortes histológicos**

Los ovarios de los animales perfundidos se deshidrataron con alcohol (JT Baker USA)  $96^{\circ}$ ,  $100^{\circ}$ , alcohol-xilol durante 1 hora y en xilol (JT Baker USA) por 5 minutos, posteriormente se incluyeron en parafina y se formaron bloque que contenían la gónada (Figura 28). Se realizaron cortes seriados de cada ovario de  $5\ \mu\text{m}$ , con ayuda de un micrótopo y se colectaron tres cortes en portaobjetos previamente cargados con Poli-L-lisina (Sigma Chemical, St Louis USA). Se destinó una laminilla para las siguientes evaluaciones: células positivas a TUNEL (apoptosis), identificación de la enzima aromatasa y del receptor a serotonina  $5\text{-HT}_7$  (Figura 29).

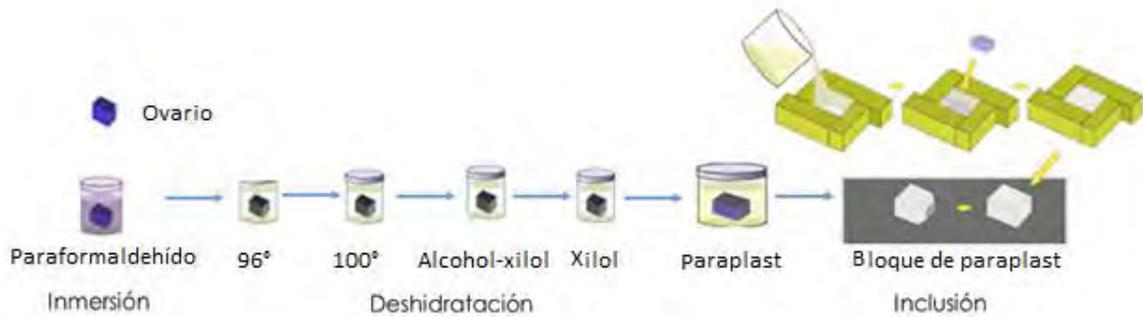


Figura. 28 Representación del procedimiento de inclusión de los ovarios. Atlas de histología vegetal y animal (<http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/3-arafina.php>).



Figura. 29 Representación de la técnica para montaje de cortes histológicos. Atlas de histología vegetal y animal. <http://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/3-parafina.php>.

### Detección de apoptosis

Para la identificación de apoptosis en las células de la granulosa de los folículos, los cortes histológicos se procesaron siguiendo la técnica de TUNEL propuesta por Billig y colaboradores (1993). Se utilizó un kit comercial (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN, USA). Las células de la granulosa en apoptosis se marcan y presentan una coloración café. Al control positivo se le adicionó la enzima DNAasa I (Invitrogen, USA), que induce la fragmentación del ADN en las células, lo que permite que la marca se una al ADN fragmentado y por lo tanto las células resultan positivas a TUNEL, mientras que en el control negativo no se colocó la enzima y las células no presentan la coloración café.

En los folículos en los que se realizó la evaluación del número de células en apoptosis, con ayuda de un ocular micrométrico modelo filar F2 marca Nikon Japón,



adaptado a un microscopio modelo 137644 marca Nikon Japón, se midió el diámetro mayor (D1) y el perpendicular al primero (D2). Con ambas mediciones se calculó el diámetro promedio (Dp) con la relación:  $Dp = [D1 + D2]/2$ .

Con base en el diámetro promedio los folículos se clasificaron en:

-  Clase 1= <100  $\mu\text{m}$
-  Clase 2= 101-199  $\mu\text{m}$
-  Clase 3= 200-349  $\mu\text{m}$
-  Clase 4= 350-499  $\mu\text{m}$
-  Clase 5= 500-999  $\mu\text{m}$

Con base en el número de células positivas a TUNEL, los folículos se clasificaron en las siguientes categorías (modificado de Kim y col., 1999):

-  Marca moderada: 1 a 5 células
-  Marca intensa: 6 a 15 células, con presencia o no de cuerpos apoptóticos en el antro del folículo
-  Marca muy intensa: más de 15 células, con presencia o no de cuerpos apoptóticos en el antro del folículo.

### Cuantificación de Estradiol

La cuantificación de  $17\beta$ -estradiol en el suero se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis, mediante un kit (Coat-A-Count, Diagnostic Products, USA). La concentración de cada una de las muestras se calculó con base en la siguiente curva del calibrador. Cuadro 3.

Cuadro 3. Curva de concentración de estradiol en cada muestra.

N°. de tubo	Concentración del calibrador en pg/mL
1	0.0
2	10
3	20
4	50
5	150
6	500
7	1800

### Detección de enzima aromatasa y receptor 5-HT<sub>7</sub>

La identificación de la enzima aromatasa y el receptor a serotonina 5-HT<sub>7</sub> se realizó mediante inmunohistoquímica, siguiendo la metodología propuesta por Kim (1999) y Khalmuratovaa y colaboradores (2010), respectivamente. Se destinó una laminilla para cada evaluación. Los cortes se desparafinaron en xilol, se hidrataron al pasar las laminillas por una serie de soluciones decreciente (100°, 96° y 70°) por 5 minutos y finalmente en agua destilada. Las preparaciones de procesaron con peróxido de hidrógeno (JT Baker USA) al 0.3 % en metanol durante 45 minutos para bloquear las peroxidasas endógenas. Se procedió a incubar con el anticuerpo primario a una dilución 1/100 durante toda la noche a 4 °C. Posteriormente se incubó con el anticuerpo secundario monoclonal (biotinilado), anti-IgG de conejo (dilución (1/200), durante 45 minutos a temperatura ambiente. La identificación de la aromatasa y del receptor se realizó por el método de avidina-biotina peroxidasa, durante la cual se utilizó la diaminobenzidina (Invitrogen, USA) para la identificación de las proteínas que se identifican de color marrón. Las laminillas se contrastaron con Hematoxilina de Harris. Las respectivas laminillas para cada evaluación se montaron con medio de montaje Permout (Sigma Chemical, St Louis, USA) y se cubrieron con un cubreobjetos. Los anticuerpos empleados, la casa comercial y el tipo de anticuerpo (monoclonal o policlonal) se resumen en el cuadro 4. Como control de la técnica, algunas laminas fueron tratadas sin el anticuerpo primario correspondiente y posteriormente se procesaron como se describe en esta sección.

Cuadro 4. Anticuerpos empleados en la inmunohistoquímica

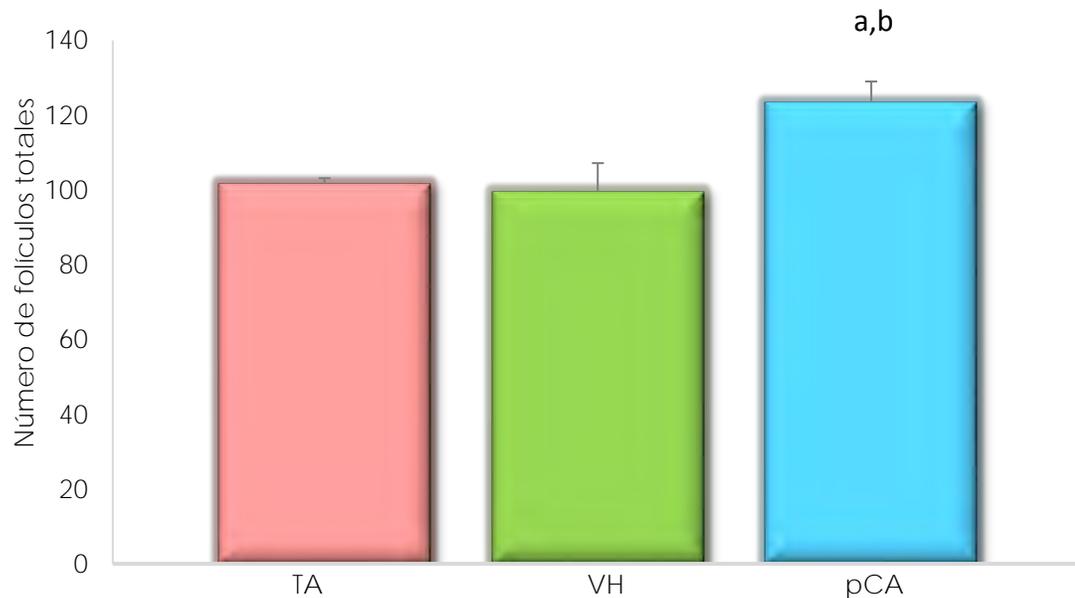
<i>Anticuerpo</i>	<i>Casa Comercial</i>	<i>Origen</i>
Anticuerpo primario <i>Aromatasa</i>	abcam <i>ab18995</i>	<i>Policlonal</i>
Anticuerpo primario <i>5-HT<sub>7</sub></i>	Santa Cruz <i>anti-5-HT<sub>7</sub></i>	<i>Monoclonal</i>
<i>Anticuerpo Secundario</i>	Sigma-Aldrich <i>Anti-IgG</i>	<i>Policlonal</i>

### Análisis estadístico

La concentración de estradiol en suero se analizó por la prueba de ANOVA seguida de la prueba de Tukey. El número total de folículos y por clase se analizaron por la prueba de Kruskal Wallis, seguido de la prueba de Dunn. El porcentaje de folículos positivos a TUNEL, a la enzima aromatasa o al receptor 5-HT<sub>7</sub> se analizaron por la prueba de Chi cuadrada. En todos los casos únicamente se consideraron significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad (p) fue igual o menor al 0.05. todos los análisis se realizaron con el programa GraphPad InStat, versión número 3.

## Resultados

En los ovarios de los animales a los que se les administró VH o pCA se modificó el número total de folículos en comparación con el grupo TA (Gráfica).

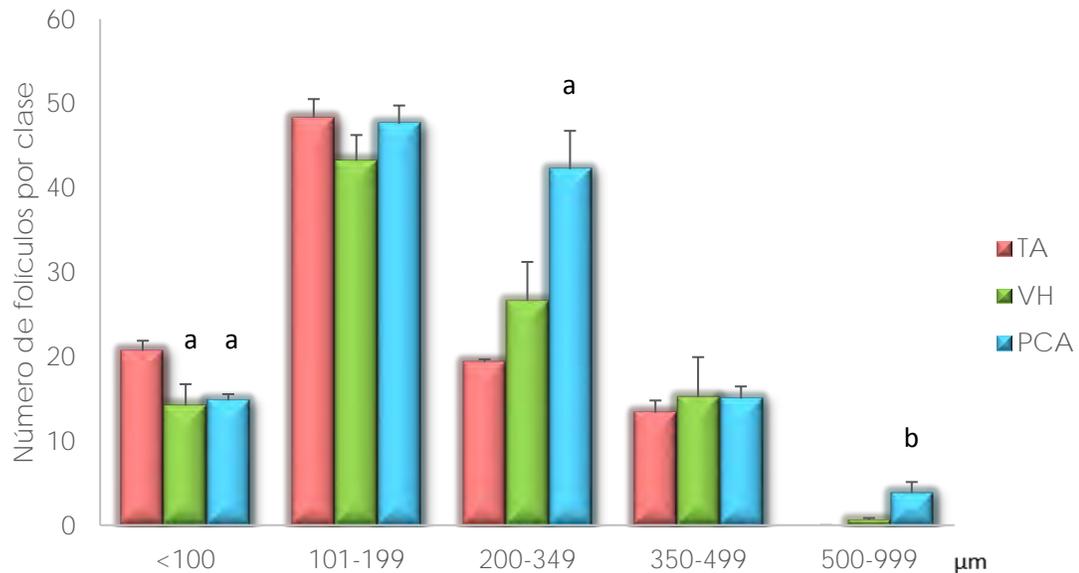


a,  $p < 0.05$  vs. Grupo con TA (Kruskall Wallis, seguido de la prueba de Dunn).

b,  $p < 0.05$  vs. Grupo con VH (Kruskall Wallis, seguido de la prueba de Dunn).

Gráfica 1. Número de folículos totales en los ovarios de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 de edad y sacrificadas a las 120 horas postratamiento.

En los animales TA no se observaron folículos de 500-999  $\mu\text{m}$ . En los que se les administró VH el número de folículos  $< 100 \mu\text{m}$  fue menor en relación al grupo TA. En los tratados con PCA fue menor el número de folículos  $< 100 \mu\text{m}$  y se incrementó el número de folículos de 200-349  $\mu\text{m}$  y de 500-999  $\mu\text{m}$  (Gráfica 2).



a,  $p < 0.05$  vs. Grupo con TA (Kruskall Wallis, seguido de la prueba de Dunn).

b,  $p < 0.05$  vs. Grupo con VH (Kruskall Wallis, seguido de la prueba de Dunn).

Gráfica 2 Número de folículos por clase en los ovarios de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con *p*-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 de edad y sacrificadas a las 120 horas postratamiento.

### Apoptosis

En la figura 30, se muestra un corte de ovario en el que se observan folículos atrésicos con células de la granulosa con marca positiva a TUNEL (color marrón) y folículos que no expresan marca (color violeta o azul).

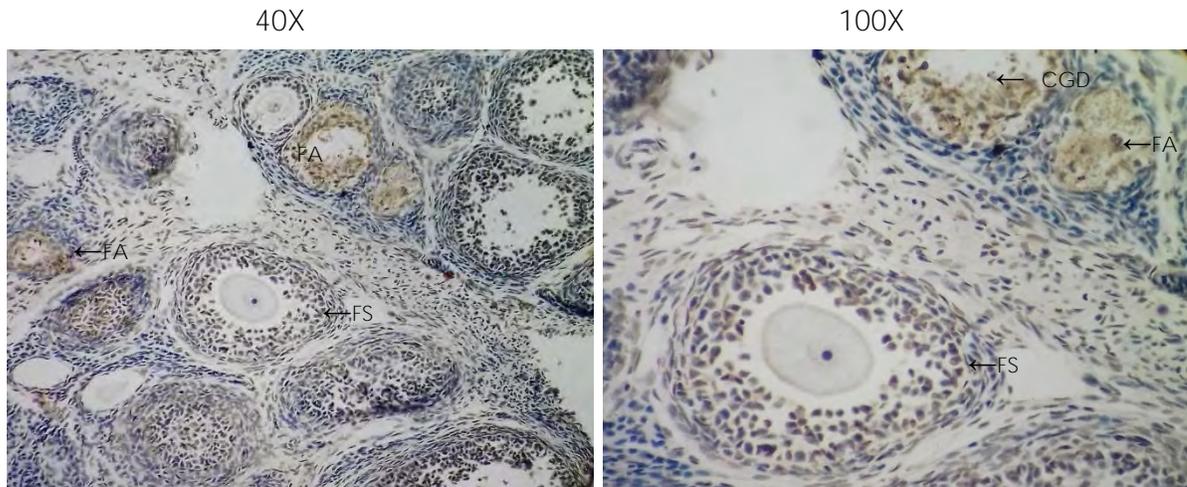
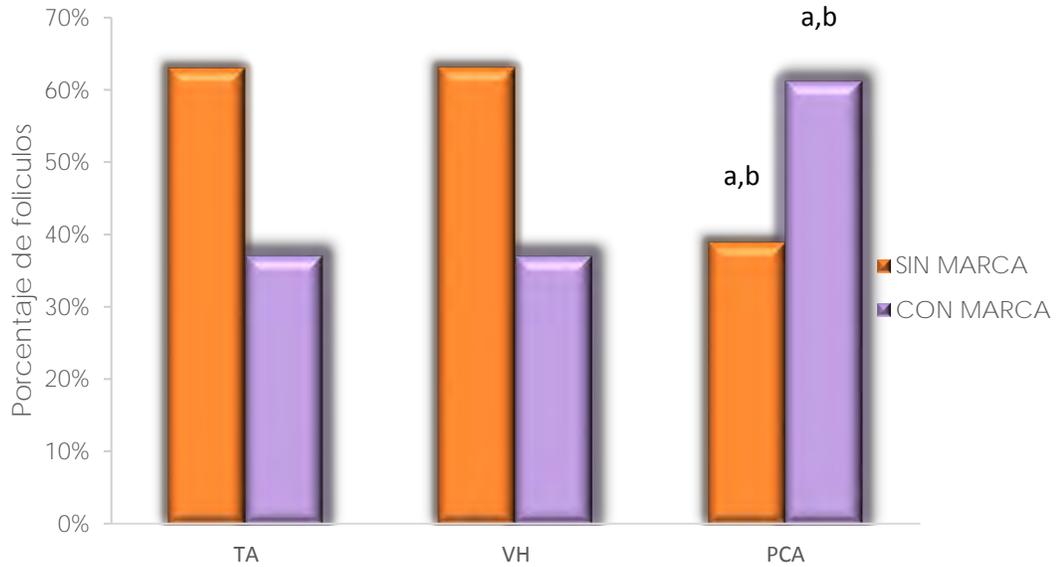


Figura 30. Fotomicrografía de cortes de ovario de ratas teñidos por la técnica de TUNEL, en la que se observan folículos con células de la granulosa positivas a TUNEL (color café) en un folículo atrésico (FA) y células sin marca (color violeta) en un folículo sano (FS). Células de la granulosa descamadas (CGD).

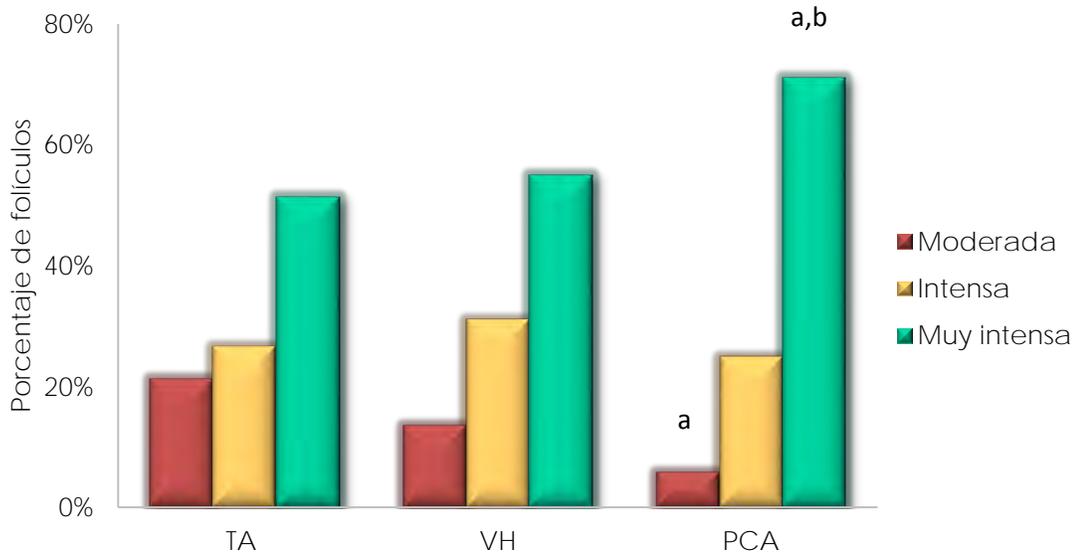
En comparación con el grupo de animales TA, en los tratados con VH no se modificó el número de folículos con células de la granulosa positivas a TUNEL, con marca. En los animales que se trataron con pCA se observó incremento en los folículos con marca (Gráfica 3).

Considerando el número de las células de la granulosa positivas a TUNEL por folículo, en los ovarios de los animales que se trataron con VH no se observaron cambios significativos en este parámetro en comparación con los animales TA, mientras que, en los que se les administró la pCA, disminuyó el porcentaje de folículos con marca moderada (de 1 a 5 células marcadas). No se modificó el de folículos con marca intensa (6 a 10 células marcadas) y se incrementó el porcentaje de folículos con marca muy intensa (más de 15 células marcadas) (Gráfica 4).



a,  $p < 0.05$  vs. Grupo TA (Prueba de Chi-cuadrada).  
 b,  $p < 0.05$  vs. Grupo con VH (Prueba de Chi-cuadrada).

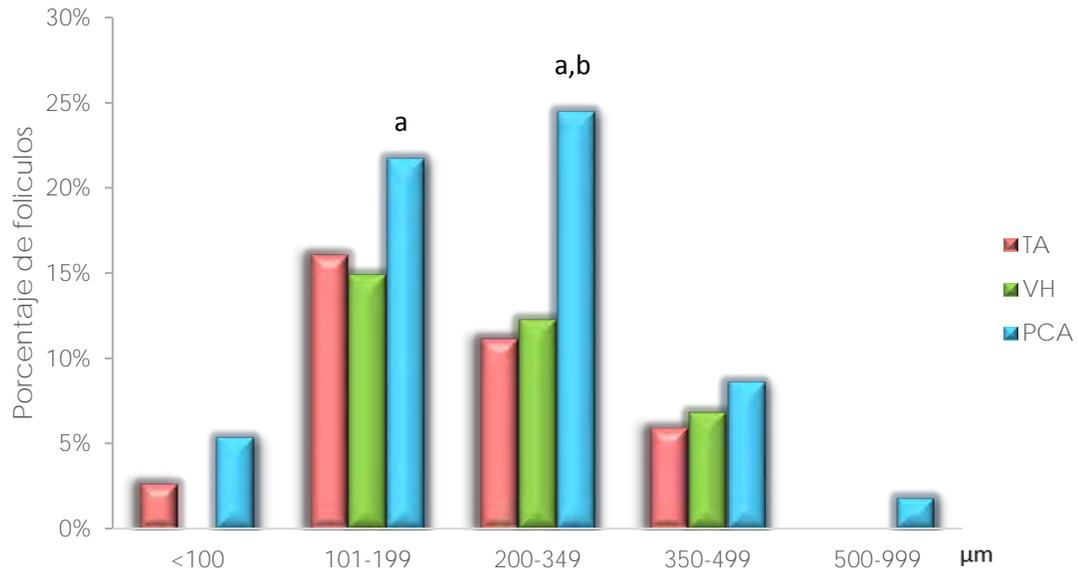
Gráfica 3 Porcentaje de folículos totales con marca positiva a TUNEL o sin marca en los ovarios de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 de edad y sacrificadas a las 120 horas postratamiento.



a,  $p < 0.05$  vs. Grupo TA (Prueba de Chi cuadrada).  
 b,  $p < 0.05$  vs. Grupo con VH (Prueba de Chi cuadrada).

Gráfica 4 Porcentaje de folículos totales con marca a TUNEL moderada, intensa y muy intensa en los ovarios de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 de edad y sacrificadas a las 120 horas postratamiento.

En los animales tratados con VH no se observaron folículos clase 1 (<100  $\mu\text{m}$ ) con marca. En estos animales no se modificó el porcentaje de folículos clase 2, 3, 4 y 5 con marca. En los que se trataron con pCA, el porcentaje de los folículos clase 2 y 3 con marca se incrementaron significativamente (Gráfica 5).



a,  $p < 0.05$  vs. Grupo TA (Prueba de Chi cuadrada).  
 b,  $p < 0.05$  vs. Grupo con VH (Prueba de Chi cuadrada).

Gráfica 5 Número de folículos por clase con marca en los ovarios de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 de edad y sacrificadas a las 120 horas postratamiento

La marca positiva a TUNEL se aprecia en las células de la granulosa de los folículos atrésicos de las diferentes clases, así como en el ovocito. La presencia de la marca positiva se acompañó de la desorganización de las capas de células de la granulosa, descamación en el antro folicular de células con daño, presencia de cuerpos apoptóticos, así como fragmentación y deformación del ovocito (figura 31).

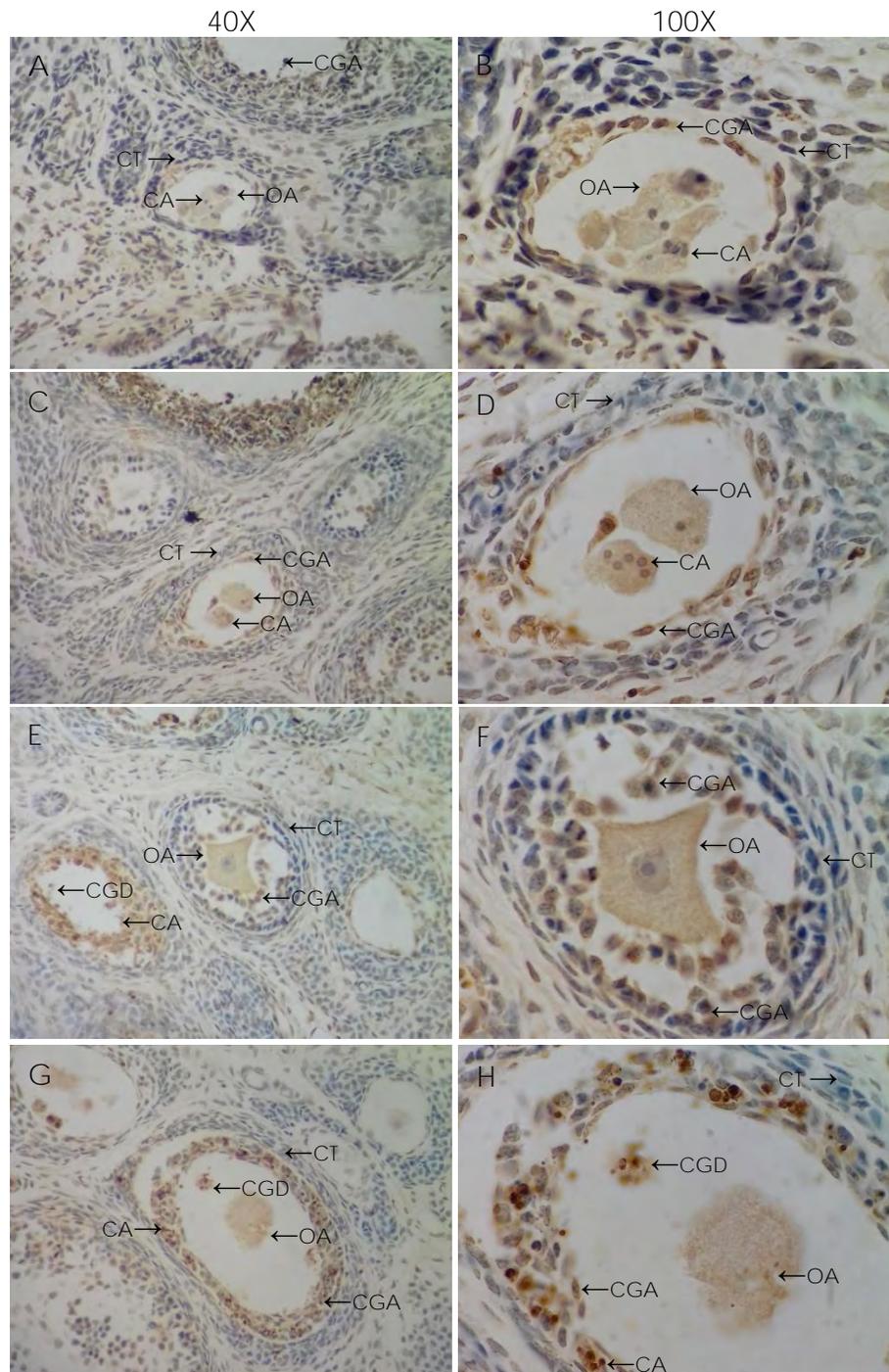
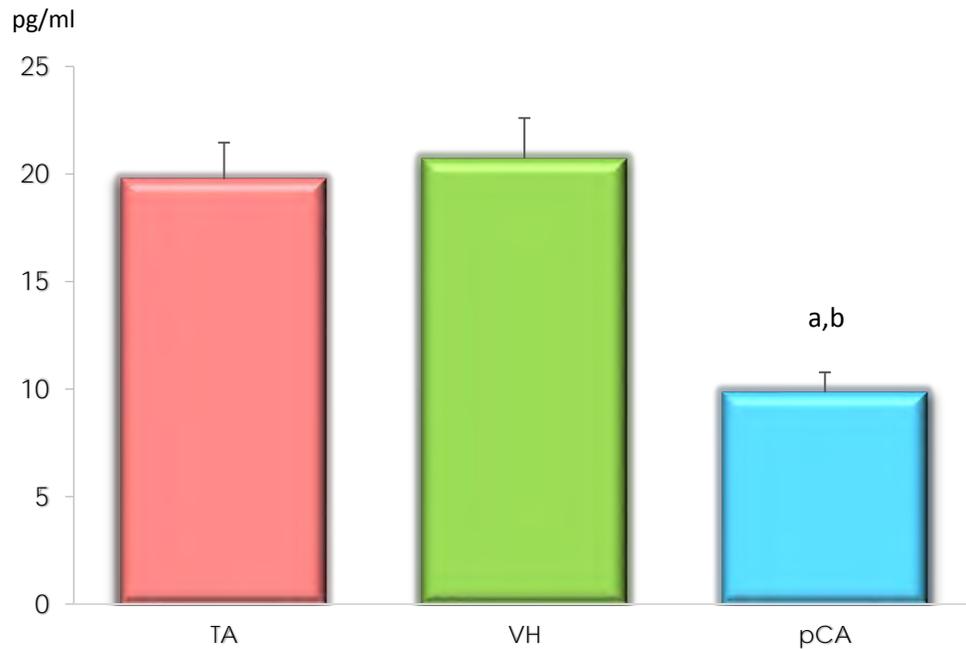


Figura 31. Fotomicrografías de cortes de ovario de ratas en las que se observan Folículos con marca positiva a TUNEL. Folículos de las clases 1 (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F) y 4 (G, H). Se observan algunas de las características de los folículos atrésicos: Células de la granulosa positivas (CGA); Células de la granulosa descamadas en el antro folicular (CGD) Ovocito con alteraciones (OA); Cuerpos apoptóticos (CA). Células de la teca (CT).

### Estradiol

En comparación con el grupo de animales TA, en los que se les administró el VH no se modificó la concentración de estradiol en el suero. En los que se les inyectó la pCA disminuyó la concentración de esta hormona (Gráfica 6).



a,  $p < 0.05$  vs. Grupo TA (Andeva seguida de Tukey).  
 b,  $p < 0.05$  vs. Grupo con VH (Andeva seguida de Tukey).

Gráfica 6 Concentración de estradiol en el suero de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 de edad y sacrificadas a las 120 horas postratamiento.

En la figura 32, se muestra un corte de ovario en el que se observan folículos con células de la granulosa con marca positiva a la enzima aromatasa (color azul marino) y folículos que no expresan marca (color violeta).

## Aromatasa

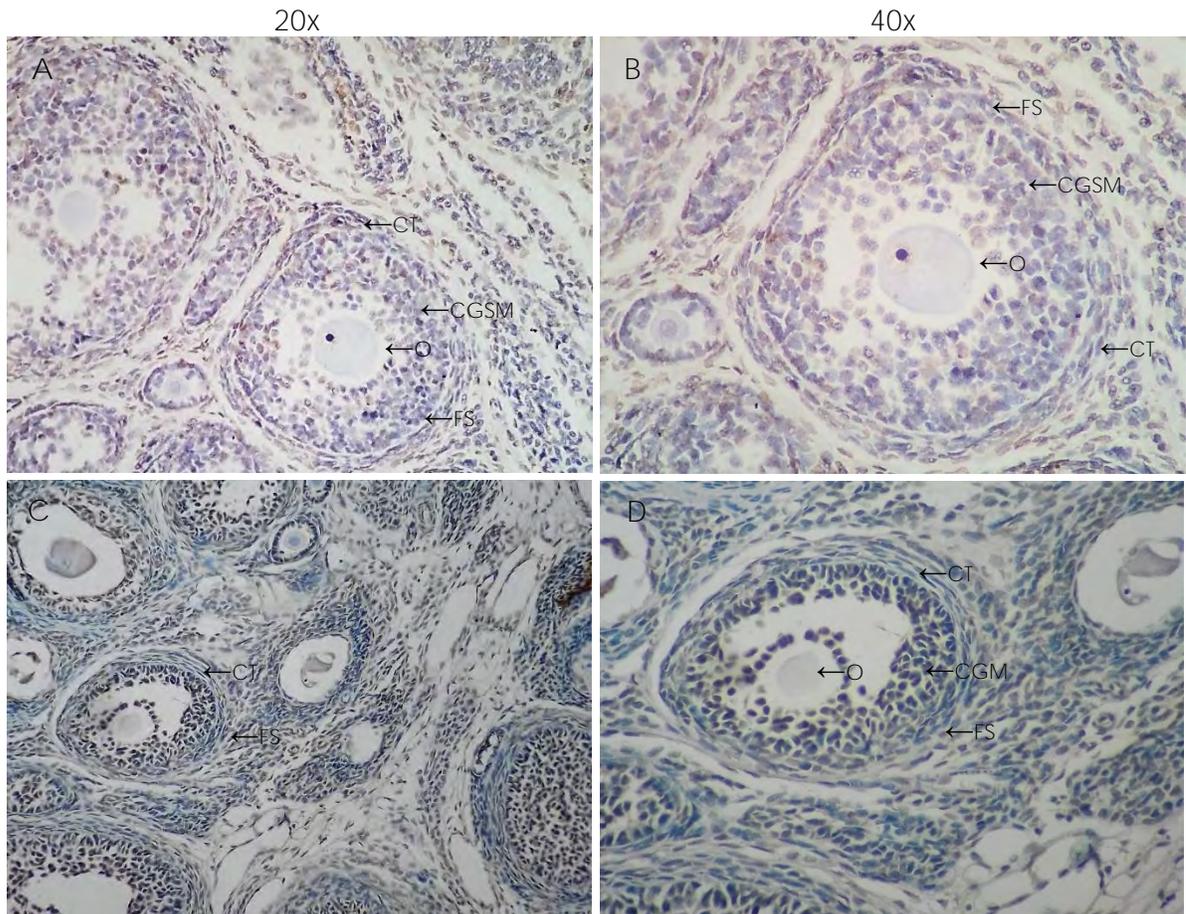
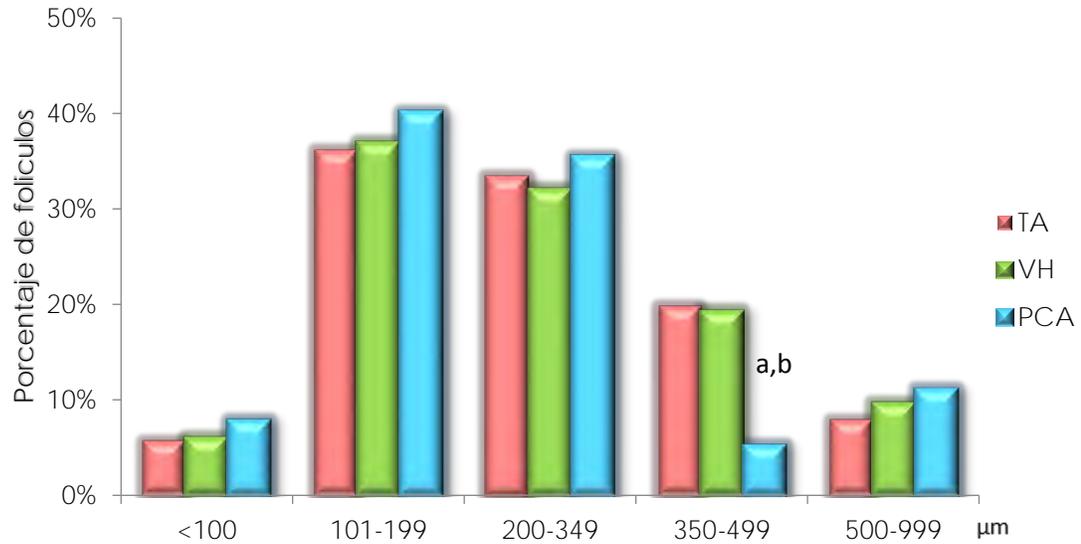


Figura 32, Fotomicrografía de cortes de ovario de ratas en las que se observa inmunomarcaje para la enzima aromatasa. La marca se observa en las células de la granulosa. Folículos sin marca (A y B), folículos con marca (C y D). Folículo sano (FS); células de la teca (CT), células de la granulosa marcadas (CGM), células de la granulosa sin marca (CGSM), ovocito (O).

El inmunomarcaje positivo para la aromatasa se identificó en las células de la granulosa de los folículos en sus diferentes etapas de desarrollo. En los grupos TA y VH el porcentaje de folículos con marca positiva para la enzima aromatasa fue similar, mientras que en el grupo de animales tratado con pCA disminuyó el porcentaje de folículos de la clase 4 (350-499  $\mu\text{m}$ ), que presentaron marca positiva para la enzima (Gráfica 7).



a,  $p < 0.05$  vs. Grupo TA (Prueba de Chi cuadrada).

b,  $p < 0.05$  vs. Grupo con VH (Prueba de Chi cuadrada).

Gráfica 7 Porcentaje de folículos por clase con marca positiva a la enzima aromatasa en los ovarios de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con *p*-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 de edad y sacrificadas a las 120 horas postratamiento.

### Receptor 5-HT<sub>7</sub>

En la figura 33, se muestra un corte de ovario en el que se observan folículos sin marca y con marca para el receptor 5-HT<sub>7</sub> en el ovocito.

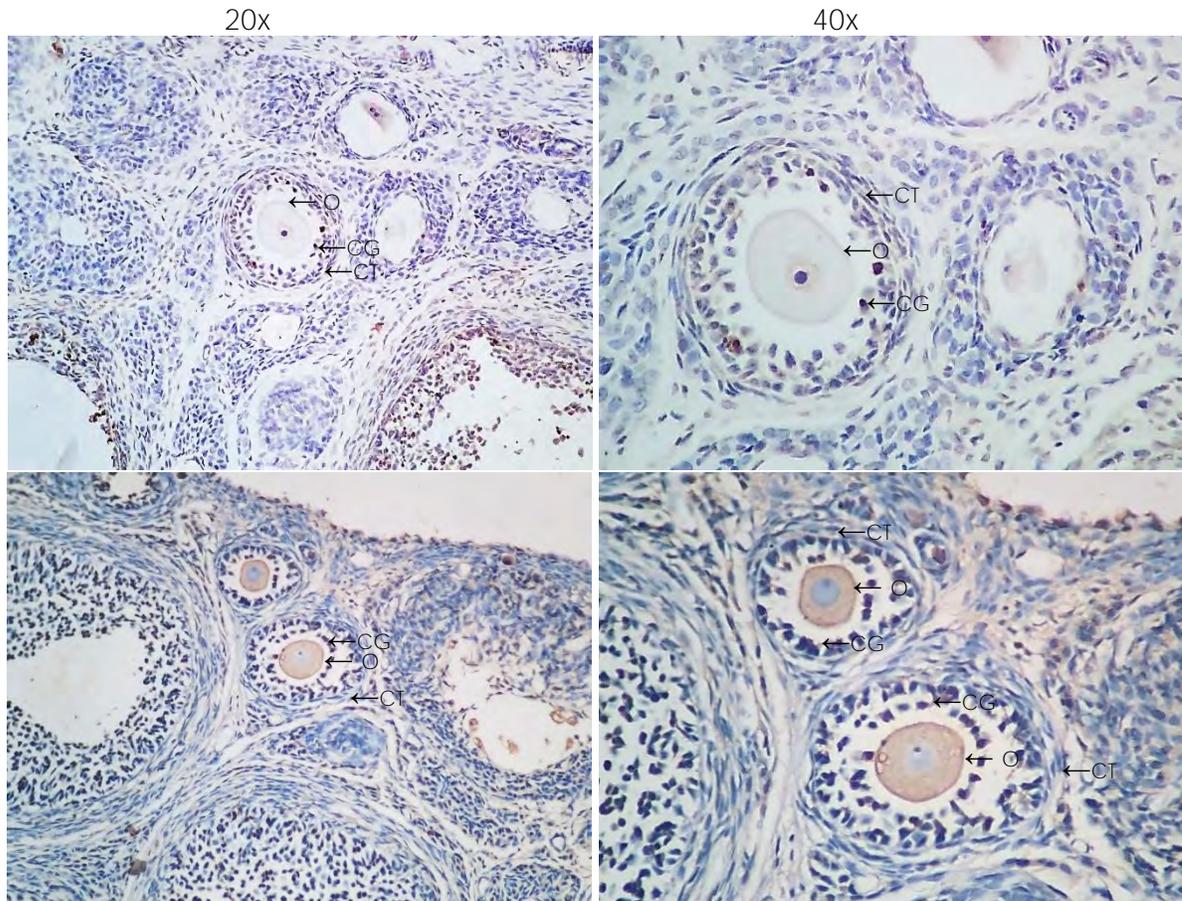
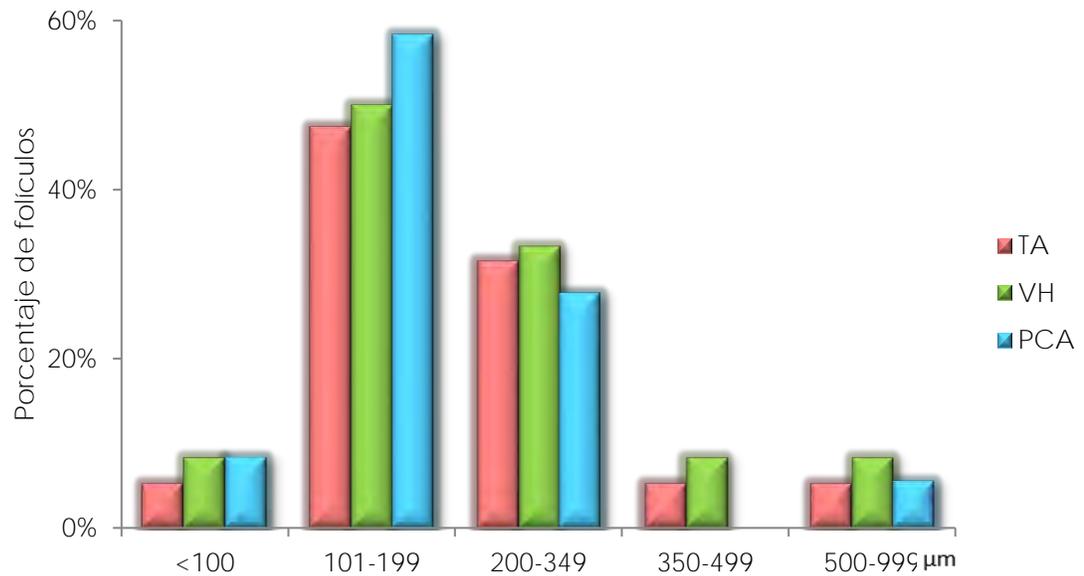


Figura 33, Fotomicrografía de cortes de ovario de ratas teñidos por la técnica de inmunohistoquímica, en la que se observa un folículo sin marca para el receptor 5-HT<sub>7</sub>, color azul (A y B) y folículos en los que el ovocito presenta marca positiva para el receptor 5-HT<sub>7</sub>, color marrón (C y D). Células de la teca (CT), células de la granulosa (CG), ovocito (O).

El inmunomarcaje para el receptor 5-HT<sub>7</sub> se observó en el ovocito de todas las etapas de desarrollo y se mantuvo en todos los folículos en sus diferentes etapas en los tres grupos experimentales (Gráfica 8).

En los animales TA o tratados con VH, el porcentaje de folículos con marca positiva al receptor 5-HT<sub>7</sub> fue similar. En los animales que se les administró pCA, no se observaron folículos de la clase 4 (350-499µm) con marca positiva al receptor 5-HT<sub>7</sub> (Gráfica 8).



Gráfica 8 Porcentaje de folículos por clase con marca positiva al receptor 5-HT<sub>7</sub> en los ovarios de ratas hembras testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (VH) o con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 de edad y sacrificadas a las 120 horas postratamiento.

En la figura 33, se muestra un corte de ovario donde se observa inmunomarcage para el receptor 5-HT<sub>7</sub> en el ovario de la rata, se aprecia la expresión de este receptor en el ovocito y en células de la granulosa (color marrón) de los folículos en las diferentes clases. En las células de la teca folicular no se observó la marca para el receptor (color violeta o azulado).

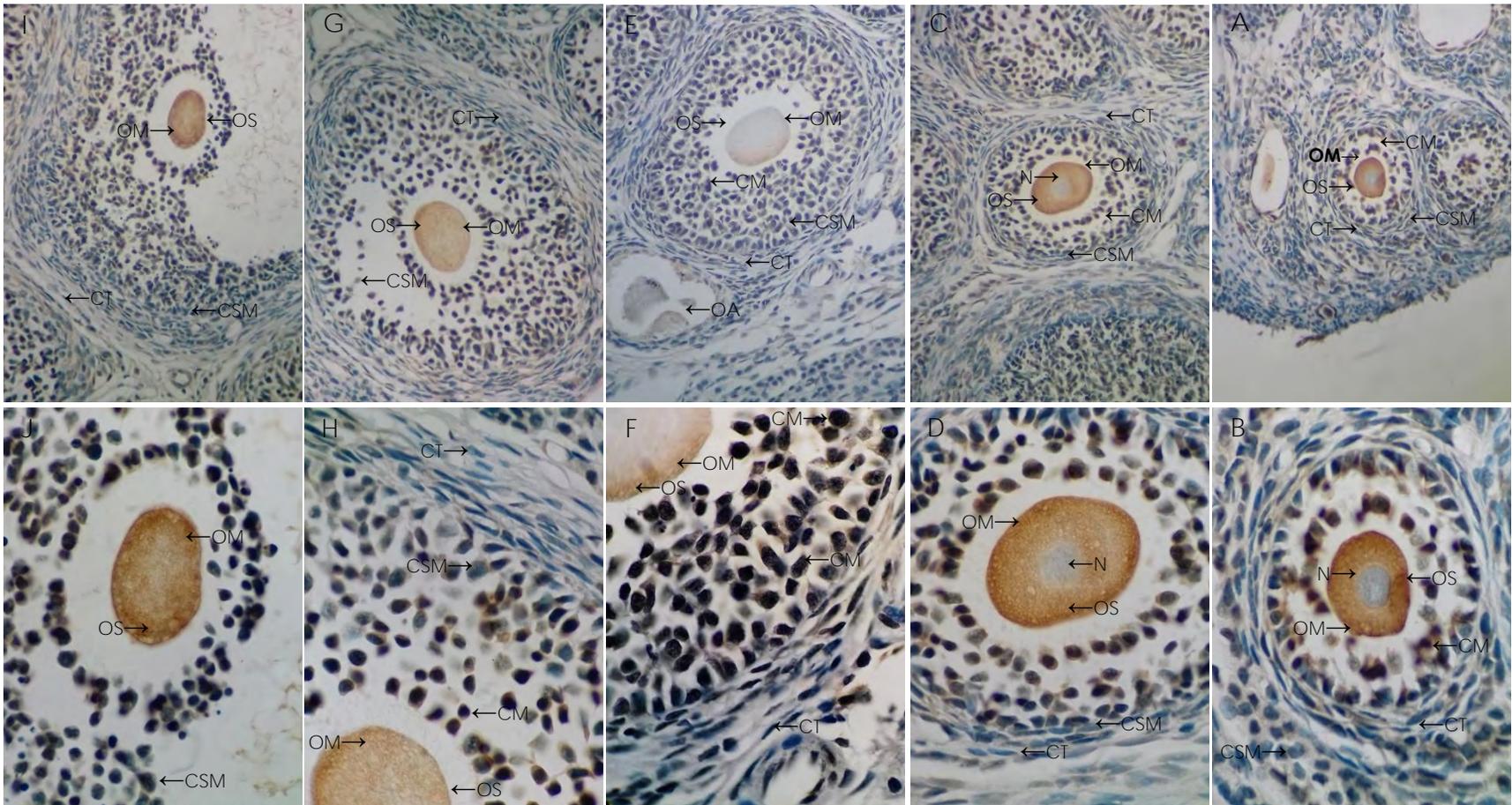


Figura 34. Fotomicrografías de cortes de ovario de ratas en las que se observa inmunomarcaje para el receptor a serotonina, 5-HT7. La marca se observa en el ovocito y en las células de la granulosa de los folículos clase 1 (A, B), 2 (C, D), 3 (E, F), 4 (G, H) y 5 (I, J). Células con marca (CM); células sin marca (CSM); ovocito con marcado (OM); células de la teca (CT) y Ovocito sano (OS), Ovocito con alteraciones (OA), núcleo (N).



## Discusión

---

Los resultados del presente estudio nos permiten sugerir que la inhibición del sistema serotoninérgico inducido por la administración de p-Cloroanfetamina induce la muerte celular por apoptosis de las células de la granulosa y la atresia del folículo ovárico, lo que se asocia con modificaciones en la síntesis de estradiol. El hecho de que en el ovario de los animales tratados con pCA se incrementara el número de folículos con células de la granulosa positivas a TUNEL, que disminuyeran los folículos que expresan la aromatasa y el receptor a serotonina 5-HT<sub>7</sub> y la concentración de estradiol apoyan esta interpretación.

El mayor número de folículos totales en los ovarios de los animales que se les administró la pCA, nos indican que se aceleró el crecimiento de los folículos, lo cual se reflejó en el aumento de los folículos clase 3 (200-349) y clase 5 (500-999). Este efecto posiblemente se asocie a modificaciones en la producción de gonadotropinas, FSH y LH, como resultado de alteraciones en la secreción de GnRH, debido a la acción de la pCA en el sistema serotoninérgico del eje hipotálamo-hipófisis. En apoyo a esta idea se ha mostrado que cuando se administra pCA por vía sistémica, atraviesa la barrera hematoencefálica y modifica el sistema serotoninérgico del hipotálamo (Pérez, 2006; Schatzberg, 2006; Robledo, 2008; Morales, 2014; Azcona, 2014). En las 24 horas posteriores a su administración, induce la liberación de serotonina de las vesículas e incrementa en la hendidura sináptica (Sanders-Bush, 1975). Además, la unión de la serotonina a su receptor 5-HT<sub>2</sub> en el área preóptica hipotalámica anterior, estimula la secreción de GnRH y de la FSH (Gouveia y Franci, 2004), principal factor de sobrevivencia del folículo antral, debido a que induce la multiplicación de las células de la granulosa y el desarrollo del folículo (Markström y col., 2002). Con base en las evidencias anteriores, es posible proponer que a corto plazo el aumento en la liberación de serotonina favoreció la secreción de la FSH, lo que se acompañó del desarrollo de los folículos antrales.

También es posible que la serotonina modificara localmente en la hipófisis la secreción de FSH. La hipófisis recibe inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo del rafe (Whitaker-Azmitia, 2001; Rang y col., 2004; Linder y col., 2007). Aunado a esto, cuando en la rata hembra de 30 días de edad se le administra por vía sistémica el precursor de la síntesis de serotonina 5-hidroxitriptofano, aumenta la concentración de serotonina en la hipófisis y de FSH en el suero (Cortes, 2009).



Otra posibilidad es que en la hipófisis se incrementara la concentración de serotonina a corto plazo, inducido por la administración de pCA, lo que se acompañó del aumento en la producción de FSH. Esta idea se sustenta en las evidencias que muestran que la hipófisis recibe inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo del rafé (Whitaker-Azmitia, 2001; Rang y col., 2004; Linder y col., 2007). La posibilidad de que la serotonina en la hipófisis estimule la producción de FSH se apoya en los resultados que muestran que cuando en la rata hembra de 30 días de edad se administra por vía sistémica el precursor de la síntesis de serotonina, 5-hidroxitriptófano, aumenta la concentración de serotonina en la hipófisis y de FSH en el suero a las 120 h postratamiento (Cortés, 2009).

La disminución en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol observada de los animales que se les administró pCA posiblemente éste asociado a la modificación en la producción de FSH. Se ha mostrado que esta gonadotropina en las células de la granulosa estimula la cascada de señalización que activa a la enzima aromatasa, que induce la transformación de los andrógenos a estrógenos (Yen y col., 2001; Chedrese, 2003; Silbernagl, 2009; Gómez-Chang y col., 2012).

Otro posible sitio de acción de la pCA es la propia gónada, es posible que modificara la respuesta del ovario a la acción de las gonadotropinas y como consecuencia la producción del estradiol. Esta idea se sustenta en las evidencias que muestran la presencia de los receptores a serotonina 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en las células de la granulosa del cumulus y en el ovocito. Por lo que se propone que la serotonina producida localmente ejerce una regulación autocrina y paracrina en la esteroidogénesis (Vecelá col., 2003; Amireault y Dubé a y b, 2005). Además se ha mostrado que la serotonina estimula la secreción de estradiol en folículos preovulatorios de rata (Tanaka y col., 1993), hámster (Terranova col., 1990), cerdo (Sirotkin, 1995) y humanos (Graveleau col., 2000; Koppa col., 2004).

El desarrollo del folículo y la atresia son eventos que dependen de la proliferación y sobrevivencia de las células de la granulosa (Veronina col., 2007). En nuestro estudio, cuando se analizó el estado de los folículos se observó que el aumento en el número de folículos de la clase 3 y 5 también se acompañó del aumento de folículos con células de la granulosa positivas a TUNEL, evento que conduce a la atresia del folículo ovárico (Veronina col., 2007). El porcentaje de folículos con marca intensa se incrementó. Esto posiblemente se asoció con la disminución en la





secreción de FSH, ya que se ha mostrado que cuando disminuye la concentración de FSH se incrementa la atresia del folículo (Markström y col., 2002).

Es posible que después del aumento inicial en la secreción de FSH, como resultado de la liberación de serotonina en la terminal serotoninérgica, disminuyera la concentración de esta hormona. En relación a esto se ha mostrado que la administración de una dosis de pCA a la rata adulta (Sanders-Bush, 1975) o en la prepúber de 30 días de edad (Pérez, 2006; Morales, 2014; Azcona, 2014) disminuye en un 40 % la concentración de serotonina en el hipotálamo a las 48 horas postratamiento y este efecto se mantiene hasta por 10 días (Sanders-Bush y col., 1972). La disminución en la concentración de serotonina es el resultado de la inhibición de la enzima, triptófano hidroxilasa, lo que se acompaña de la disminución en la síntesis de serotonina (Sander-Bus y col., 1972; Lorenzo, 2003). Por lo tanto, es posible que la menor concentración de serotonina en el hipotálamo se acompañara de la disminución en la secreción de FSH y del aumento de la apoptosis en las células de la granulosa.

La posibilidad de que la serotonina en el hipotálamo es esencial en el mantenimiento del desarrollo del folículo ovárico, se sustenta en la evidencia que muestra que cuando en la rata hembra de 30 días de edad, se elimina la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé, disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo y en el ovario se incrementa la atresia de los folículos de 500-999  $\mu\text{m}$  (Ayala col., 1994), que en nuestro estudio corresponde a la clase 5.

El desarrollo y atresia folicular es regulado por productos locales como los estrógenos y factores de crecimiento (Chun col., 1996). Con base en lo anterior, es posible que en los animales tratados con pCA, el incremento en la apoptosis en los folículos se relacione con la disminución en la secreción de FSH. Tal idea se sustenta en los resultados que muestran que cuando disminuye la producción de la gonadotropina se incrementa la atresia, efecto que se revierte por la administración de FSH o estrógenos (Billig col. 1994; Billig col. 1993). Además, en la transición de los folículos preantrales a antrales, que en nuestro estudio corresponde a la etapa 3 (200-349  $\mu\text{m}$ ), estos responden a la acción de las gonadotropinas y su posterior desarrollo depende de la acción de estas hormonas, debido a que expresan los receptores a FSH que es un factor de sobrevivencia que inhibe la apoptosis de las células de la granulosa (McGeen y Hsueh, 2000).





Otra posible explicación al incremento en el porcentaje de folículos con células positivas a TUNEL, se relacione con la disminución en la concentración de estradiol, es posible que este evento favoreciera el proceso de apoptosis en las células de la granulosa, ya que el estradiol estimula la proliferación de las células de la granulosa, incrementa los receptores a FSH, favorece la expresión de los receptores a LH y actúa como un factor de sobrevivencia de las células de la granulosa (McGeen y Hsueh, 2000). Además, se ha mostrado que las células de la granulosa expresan el receptor a estrógenos, ER $\beta$  (Jefferson col., 2000). Cuando no se expresa este receptor a estrógenos  $\beta$ , disminuye el número de folículos en crecimiento (Krege col., 1998). Aunado a esto, en ratas prepúberes hipofisectomizadas el implante de dietilbestrol estimula el desarrollo de los folículos antrales sanos. Cuando se suspende dicho estímulo se incrementa la apoptosis en las células de la granulosa (Billing col., 1993).

En este estudio mostramos que en los ovarios de los animales que se les administró pCA, no se observaron folículos de la clase 4 (350-499  $\mu\text{m}$ ) que expresan aromatasa. El significado fisiológico de este evento se relaciona con la menor concentración de estradiol en el suero de estos animales. La presente idea se sustenta en las evidencias que muestran que la aromatasa en las células de la granulosa, transforma los andrógenos en estrógenos. Además, en los folículos antrales, las células de la teca son maduras y su actividad esteroidogénica se encuentra bajo el control de la LH, incrementando la cantidad de andrógenos que difunden hacia las células de la granulosa para ser aromatizados a estradiol (Young y McNeilly, 2010).

La identificación del receptor 5-HT $_7$  en el ovocito de los folículos en las diferentes etapas del desarrollo coincide con lo reportado por otros autores, quienes identifican a este receptor en el ovocito y en las células del cumulus en el ratón (Amireault y Dubé, 2005 a). La presencia del receptor 5-HT $_7$  en el ovocito, permite pensar que la serotonina participa en la regulación del desarrollo o fisiología del folículo ovárico, mediado por la unión a este receptor. En relación a esto, conforme el folículo crece se producen señales paracrinas bidireccionales entre el ovocito y las células de la granulosa que forman el cumulus (Combelles col., 2004). Los ovocitos en los folículos antrales secretan factores que modulan la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y la producción de esteroides (Vanderhyden y col., 1992; Vanderhyden y col., 1993; Vanderhyden y Tonary, 1995).





### *García Galicia Magaly*

Con lo antes mencionado es posible suponer que la serotonina vía su unión al receptor 5-HT<sub>7</sub> regule diferentes procesos que involucran al ovocito y a las células del cumulus y que incluyen crecimiento folicular y esteroidogénesis. Esta idea se sustenta en el hecho de que disminuyeron los folículos que expresan la aromatasa y el receptor a serotonina 5-HT<sub>7</sub>.



## Conclusiones

---

- ✚ El receptor a serotonina 5-HT<sub>7</sub> se expresa en el ovocito de los folículos en diferentes etapas del desarrollo.
- ✚ La enzima aromatasa se expresa en las células de la granulosa de los folículos en las diferentes etapas del desarrollo.
- ✚ La administración de p-Cloroanfetamina, disminuye el número de folículos antrales (clase 4) que expresan la enzima aromatasa y el receptor 5-HT<sub>7</sub>.
- ✚ La administración de, p-Cloroanfetamina, disminuye la concentración de estradiol en el suero.
- ✚ La administración de, p-Cloroanfetamina, incrementa la apoptosis en las células de la granulosa.
- ✚ El sistema serotoninérgico del ovario es esencial en la regulación del desarrollo del folículo ovárico y en la esteroidogénesis.

## Referencias

- Aghajanian, G.K., Lakoski, J.M. (1984). Hyperpolarization of serotonergic neurons by serotonin and LSD: studies in brain slices showing increased K<sup>+</sup> conductance. *Brain*. 305(1):181-185.
- Aghajanian, G.K., Sanders-Bush, E. (2002). *Neuropsychopharmacology: The fifth generation of progress*. U.S.A. Editors. Lippincott Williams y Wilkins. pp. 15-34.
- Aldo, R., Eynard, M.A., Valentich, R.A. (2008). *Histología y embriología del ser humano: bases celulares y moleculares*. U.S.A. Editorial Médica Panamericana. pp. 489-492.
- Alexander, M., Rothman, R.B., Baumann, M.H., Endres C.J., Brasic, J.R., Wong, D.F. (2005). Noradrenergic and dopaminergic effects of amphetamine-like stimulants in the baboon papio Anubis. *Synapse*. 56(1):94-99.
- Alfaro, E., García, C., Dueñas, A. (2000). Métodos de detección de la apoptosis, aplicaciones y limitaciones. *Revista del Instituto Nacional de Cardiología*. 46(4):275-280.
- Alles, G.A. (1932). The Comparative physiological actions of the DL- $\beta$ -phenylisopropylamines. Pressor effect and toxicity. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 47(1):339-354.
- Amireault, P., Dubé, F. (2005) a. Serotonin its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biology of Reproduction*. 73(2):358-365.
- Amireault, P., Dubé, F. (2005) b. Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complexes. *Molecular pharmacology*. 68(6):1678-1687.
- Ascona, V.M., Ayala, M.E., Cruz, H.O., Chavira, R.R., Domínguez, C.R. (2013). Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina (pCA) en el sistema serotoninérgico del eje hipotálamo-hipófisis y en la secreción de hormonas esteroides. LVI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Tlaxcala, Tlaxcala México, septiembre 1-5.
- Asser, A., Taba, P. (2015). Psychostimulants and movement disorders. *Frontiers in Neurology*. 6(75):1-13.





- Ayala, M.A., Rosas, P., Dominguez, R. (1994). Different effects of unilateral and bilateral lesion of the dorsal raphe nucleus on puberty a first ovulation. *Brain Research Bulletin*. 60(1):307-315.
- Ayala, M.E. (2009). Brain serotonin, psychoactive drugs, and effects on reproduction. *Central Nervous System Agents in Medicinal Chemistry*. 9(4):258-276.
- Azmitia, C.F., (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Research Bulletin*. 56(5): 413–424.
- Azmitia, E.C. (2010). 1-Evolution of serotonin: sunlight to suicide. *Hanbook of Behavioral Neuroscience*. 21(3):3-22
- Baker, L.P., Nielsen, M.D., Impey, S., (1998). Stimulation of type 1 and type 8 Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-sensitive adenylyl cyclases by the Gs-coupled 5-hydroxytryptamine subtype 5-HT<sub>7A</sub> receptor. *Journal of Biology Chemistry*. 273(1):17469–17476.
- Banasr, M., Hery, M., Printemps, R., Daszuta, A. (2004). Serotonin-induced increases in adult cell proliferation and neurogenesis are mediated through different and common 5-HT receptor subtypes in the dentate gyrus and the subventricular zone. *Neuropsychopharmacology*. 29(3):450-460.
- Barenys, M., Macia, N., Campos, L., De Lapuente, González-Linares, J., Borrás, M., Rodamilans, M., Llobet, J.M. (2010). MDMA (ecstasy) delays pubertal development and alters sperm quality after developmental exposure in the rat. *Toxicology Letters*. 197(1):135-142.
- Barrett, K.E., Barman, S.M., Boitano, S., Brooks, H. L. (2010). *Ganong, Fisiología Médica*. 23<sup>a</sup> Edición, McGraw Hill Interamericana Editores. España. pp. 275-280.
- Battista, P.J., Condon, W.A. (1986). Serotonin induced stimulation of progesterone production by cow luteal cells in vitro. *Journal of Reproduction & Fertility*. 76:231-238.
- Benarroch, E.E. (2013). Monoamine transporters structure, regulation, and clinical implications. *Neurology*. 81(8):761-768.
- Berger, M., Gray, J.A., Roth, BL. (2009). The expanded biology of serotonin. *Medicine*. 60(1):355–366.





- Bernard, D.J., Fortin, J., Wang, Y., Lamba, P. (2010). Mechanisms of FSH synthesis: what we know, what we do not, and why you should care. *Fertility Sterility*. 93(1):2465-2485.
- Best, J., Nijhout, H.F., Reed, M. (2010). Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. *Theoretical Biology and Medical Modelling*. 19(1):7-34.
- Billig, H., Furuta, I., Hsueh, A.J.W. (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 133(5):2204-2212.
- Billig, H., Furuta, I., Hsueh, A.J.W. (1994). Gonadotropin-releasing hormone directly induces apoptotic cell death in the rat ovary: biochemical and in situ detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in granulosa cells. *Endocrinology*. 134(1):245-251.
- Billig, H., Furuta, K.O., Hsueh, A.J. (1993). Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis. *Endocrinology*. 133(5):2204-2212.
- Biocompare. (2015). Watch cells die with these TUNEL assay kits: Apoptosis Detection Using Terminal Transferase and Biotin-16-dUTP (TUNEL Fluorescent Method). Recuperado de <http://www.biocompare.com/Editorial-Articles/159614-Watch-Cells-Die-with-These-TUNEL-Assay-Kits/>.
- Bódis, J., Toörök, A., Tinneberg, H.R., Hanf, V., Harmori, M., Cledon, P. (1992). Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells. *Fertility and Sterility*. 57(5):1008-1011.
- Brandan, N., Llanos, C., Miño, C., Ragazzoli, M.A., Ruiz Díaz, D.A. (2008). Principios de Endocrinología. Cátedra De Bioquímica. Facultad De Medicina. Disponible en <http://www.uaz.edu.mx/histo/Biologia/FaiUnneAr/Pdf/endocrino.pdf>
- Brinckworth, M.H., Weinbauer, G.F., Schlatt, Nieschlag, E. (1995) Identification of male germ cells undergoing apoptosis in adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*. 15(1):228-256.
- Britt, K.L., Findlay, J.K. (2002). Estrogen actions in the ovary revisited. *Journal of Endocrinology*. 175(2):269-276.
- Brown, B.W., Mattner, P.E., Carroll, P.A., Holland, E.J., Paull, D.R., Hoskinson, R.M., Rigby, R.D.G. (1994). Immunization of sheep against GnRH early in life: effects





- on reproductive function and hormones in rams. *Journal of Reproduction and Fertility*. 101(1):15-21.
- Brown, R.E. (1994). The pituitary gland and its hormones. *Neuroendocrinology*. Editor Richard E Brown.-pp. 30- 39.
- Brunton-Laurence, L. (2012). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 12ª Edición. U.S.A. Editorial McGraw Hill. pp. 67
- Brüssow, K.P., Schneider, F., Nürnbergg. (2001). Alteration of gonadotropins and steroid hormone release and of ovarian function by a GnRH antagonist in gilts. *Animal Reproduction Science*. 66(1):117-128.
- Cadoret, R.J., Langbehn, D., Caspers, K., Troughton, E.P., Yucuis, R., Sandhu, H.K., Philbert, R. (2003). Associations of the serotonin transporter promoter polymorphism with aggressivity, attention deficit, and conduct disorder in an adoptee population. *Comprehensive Psychiatry Journal*. 44(2):88-101.
- Callado, L.F. (2001). Neurobiología de la drogadicción II. Cocaína y drogas de diseño. *MyScienceWork* 4(1):197-210.
- Casa Delvalle, I. (2006). Apoptosis una muerte silenciosa. *Revista CENIC Ciencias Biológicas*. 37(1)33-42.
- Casper, R.F., Mitwally, M.F. (2006). Aromatase inhibitors for ovulation induction. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*. 91(3):760-771.
- Castellanos, F. X., y Acosta, M. T. (2011). Towards an understanding of the molecular mechanisms underlying the pharmacological treatments of attention deficit hyperactivity disorder. *Revista de Neurología*. 52(1):155-160.
- Celada, P., Puig, M.V., Artigas, F. (2013). Serotonin modulation of cortical neurons and networks. *Frontiers in Integrative Neuroscience*. 7(1):1-20.
- Chausiaux, O.E., Abel, M.H., Baxte, F.O., Khaled, W.T., Ellis, P.J.I., Charlot, H.M., Alfara, N. (2008). High Gonadal mouse a model to study the effects of the endogenous lack of gonadotropins on apoptosis. *Biology of Reproduction*. 78(1):77-90.
- Chedrese, J. (2003). Conferencia Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efecto de los esteroides. *Revista Colombiana de Ciencias Pecuarias*. 16(2):171.





- Chen, S., (2003). Structure-function studies of aromatase and its inhibitors: a progress report. *Steroid Biochemical Molecular Biology*. 86(1):231-237.
- Chun, S., Hsueh, A.J.W. (1998). Paracrine mechanisms of ovarian follicle apoptosis. *Journal Reproduction Immunology*. 39(1):63-75.
- Chun, S.Y., Eisenhauer, K.M., Minami, S., Billig, H., Perlas, E., Hsueh, AJ. (1996). Hormonal regulation of apoptosis in early antral follicles: follicle-stimulating hormone as a major survival factor. *Endocrinology*. 137(4):447-1456.
- Clark, B., Thompson, J.W., Widdrington, G. (1972). Analysis of the inhibition of pethidine N-demethylation by monoamine oxidase inhibitors and some other drugs with special reference to drug interactions in man. *British journal of pharmacology*. 44(1): 89-99.
- Clausell, D.E., Soliman, K.F.A. (1978). Ovarian serotonin content in relation to ovulation. *Experientia*. 34(3):410-411.
- Colado, M.I., O'Shea, E., Granados, R., Murray, T.K., Green, A.R. (1997). In vivo evidence for free radical involvement in the degeneration of rat brain 5-HT following administration of MDMA ("ecstasy") and p-chloroamphetamine but not the degeneration following fenfluramine. *British Journal of Pharmacology*. 121(1):889-900.
- Collado, M.I. (2008). Éxtasis: Estudios neurobiológicos en el laboratorio. *Trastornos Adictivos*. 10(3):183-189.
- Combelles, C.M.H., Carabatsos, M.J., Kumar, R.T., Matzuk, M.M., Albertini, D.F. (2004). Hormonal control of somatic cell oocyte interactions during ovarian follicle development. *Molecular reproduction and development* 69(3):347-355.
- Contreras, C.N.A., Mancillas, A.L.G. (2005). El papel de la serotonina en la dependencia al alcohol. Bases e implicaciones clínicas. *Fundación Clínica Médica Sur*. 7(1):112-125.
- Cortés, P.O. (2009). Efecto de la administración de 5-hidroxitriptofano en la secreción de progesterona y estradiol en la rata hembra prepúber. Tesis FES Zaragoza Universidad Nacional Autónoma de México.
- Coultas, L., Strasser, A. (2003). The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *In Seminars in Cancer Biology Academic Press*. 13(2):115-123.





- Cruz, H.O. (2014). Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina en la bursa del ovario en la concentración de hormonas esteroides y estructura del ovario en la rata hembra prepúber. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. U.N.A.M. México.
- Cruz, M.G.F., Izquierdo, A.E. (2006). 5-Hydroxytryptamine and plasticity in rodents. *Revista Salud Mental*. 29(3):18-23.
- Cuello, F.M., Kato, S., Saradangani, K.A., Saez, C., Gejman, R., Owen, G., Lipkowitz, S. (2006). Muerte celular medida por receptores: rol de las hormonas esteroidales ováricas en la apoptosis inducida por ligando "TRAIL" en cánceres ginecológicos. *Boletín Escuela de Medicina U.C., Pontificia Universidad Católica de Chile*. 31(1):5-15.
- Cuesta, C., García-Pedraza, J.A., García, M., Villalón, C.M., Moran, A. (2014). Role of 5-HT<sub>7</sub> receptor in the inhibition of the vasodepressor sensory CGRPergic outflow in pithed rats. *Vascular Pharmacology*. 63(1):4-12.
- Cui, J., Shen, L.R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine*. 19(1):197-209.
- De Souza, E.B., Battaglia, G. (1989). Effects of MDMA and MDA on brain serotonin neurons: Evidence from neurochemical and autoradiographic studies. *NIDA Res Monogr*. 94, 196-222.
- Delgado, C.A., Minguillon, I.C., Joglar, T.J. (2003). *Introducción a la Química Terapéutica*. 2ª Edición. España. Ediciones Díaz de Santos. pp. 265-266.
- Delgado, R., Hernández, P., Pardo, A. (2005). La apoptosis y la senescencia celular: mecanismos supresores de tumores. *Revista Cubana de Enfermería*. 144(1):1-2.
- Dewailly, D., Robin, G., Peigne, M., Decanter, C., Pigny, P., Catteau-Jonard, S. (2016). Interactions between androgens, FSH, anti-Müllerian hormone and estradiol during folliculogenesis in the human normal and polycystic ovary. *Human Reproduction Update*. 22(6):709-724.
- Díaz, F.C.F., Khan, M.I.R., Adams, G.P., Sirard, M.A., Singh, J. (2014). Granulosa cell function and oocyte competence: super-follicles, super-moms and super-stimulation in cattle. *Animal Reproduction Science*. 149(1):80-89.





- Dickerson, S.M., Cunningham, S.L., Gore, A.C. (2011). *Reproductive neuroendocrine targets of developmental exposure to endocrine disruptors*. Editors Kandakaris and A. C. Gore. U.S.A. pp. 49–118
- Dorrington, J.H., Roy O.G. Armstrong, D. (2013). *In Recent Progress in Hormone Research*. Elsevier Science. Canadá. pp. 144-160.
- Druker, R. (2005). *Regulación del apetito y control hormonal del peso corporal*. *Fisiología Médica. El Manual Moderno*. México. pp. 595-596, 606.
- Dubé, F., Amirreault, P., (2007). Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sciences*. 81(1):1627-1637.
- Duggavathi, R., Murphy, B.D. (2009). Development. Ovulation signals. *Science*. 324(1):890-891.
- Edson, M., Nagaraja, A.K., Matzuk, M.M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine*. 30(1):624-712.
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death. *Toxicology Pathology*. 35(4):495-516.
- Erickson, G.F. (2001). Role of growth factors in ovary organogenesis. *Journal of the Society for Gynecologic Investigation*. 8(1):13-16.
- Erickson, G.F., Shimasaki, S. (2001). The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertility and Sterility*. 76(5):943-948.
- Estrada, F.E., Uribe, M.C. (2002). *Atlas de histología de vertebrados*. México. Editores Universidad Nacional Autónoma de México. p.166.
- Farre, M., Álvarez, Y., Barral, D., Pardo, R., Unizony, C., Abanades, S. (2006). *Anfetaminas: Intoxicaciones agudas graves*. Editores Ars Médica. España. pp. 199-209.
- Fawcett, D. (2005). *Compendio de Histología*. España. Editorial. McGraw-Interamericana. pp 158-163, 280-292.
- Fernández-Espejo, E. (2006). Neurobiología de la adicción a psicoestimulantes. *Revista de Neurología*. 43(1):147-154.





- Filicori, M. (1999). The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertility and Sterility*. 71(3):405-414.
- Findlay, J.K., Drummond, A.E., Britt, K.L., Dyson, M., Wreford, N.G., Robertson, D.M., Groome N.P., Jones M.E.E., Simson, E.R. (2000). The roles of activin, inhibin and estrogen in early committed follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 163:81-87.
- Flores, P.F. (2005). Apoptosis y atresia folicular: un binomio esencial en el desarrollo ovárico. *Revista Veterinaria de México*. 36(1): 88-94.
- Franik, S., Kremer, J.A., Nelen, W.L., Farquhar, C., Marjoribanks, J. (2015). Aromatase inhibitors for subfertile women with polycystic ovary syndrome: summary of a Cochrane review. *Fertility and sterility*. 103(2):353-355.
- Gal, I.B., López, G.M., Martín, V.A.I., Prieto, M.J. (2007). *Bases de la fisiología*. 2ª Edición. México. Editorial Tébar. p. 476.
- Gallegos, E. (2007). *Participación de la serotonina en los mecanismos que regulan el proceso de atresia y apoptosis en el ovario de la rata durante la etapa prepuberal*. Tesis de maestría. Universidad Nacional Autónoma de México. México.
- García A.M. (2014). *Estimulación del Sistema serotoninérgico en la rata prepúber y secreción de gonadotropinas y esteroides*. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México. pp. 19-23.
- García, M., Velásquez, D., Monroy, J., Ayala, E., Domínguez, R. Efecto de la estimulación del sistema serotoninérgico en la concentración de gonadotropinas en suero y de serotonina en hipófisis y testículo en la rata macho prepúber. C-251. LI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Mérida Yucatán, México. 7 al 11 de septiembre 2008.
- García-Ostra, A., Frechilla, D., Del Rio, J. (2000). Effect of p-Cloroamphetamine on 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> Serotonin receptor expression in rat brain. *Journal of Neurochemistry*. 74(1):1790-1797.
- Geneser F., (2000). *Histología: sobre bases moleculares*. 3ª Edición. México. Editorial Médica Panamericana. pp. 89-99.





- Ghosh, D., Griswold, J., Erman, M., Pangborn, W. (2009). Structural basis for androgen specificity and oestrogen synthesis in human aromatase. *Nature*. 457(7226):219-223.
- Gilbert, S.F. (2006). *Biología del desarrollo*. 7ª Edición. España. Editorial Médica Panamericana pp. 127-139.
- Gilchrist, R.B., Ritter, L.J., Armstrong, D.T. (2004). Oocyte-somatic cell interactions during follicle development in mammals. *Animals Reproduction Science*. 82-83(1):431-446.
- Ginther, O.J. (2000). Selection of the dominant follicle in cattle and horses. *Animal Reproduction Science*. 60(1):61-79.
- Glennon, R.A., Dukat, M. (2012). *Serotonergic receptors and drugs affecting serotonergic neurotransmission*. En: Lemke T.L., Williams D.A., Foye's principles of medicinal chemistry. Lippincott Williams and Wilkins. U.S.A. pp. 365-396.
- Gómez-Chang, E., Larrea, F., Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. TIP. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15(1):24-36.
- González, M.G. (1996). *Técnicas en biología molecular, teoría y práctica*. México. Editorial AGT. p. 189.
- Gouveia, E.M., Rodríguez, C.F. (2004). Involvement of serotonin 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion. *Brain Research Bulletin*. 63(3):243-251.
- Graveleau, C., Paust, H.J., Schmidt-Grimminger, D., Mukhopadhyay, A.K. (2000). Presence of a 5-HT<sub>7</sub> receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 85(3):1277-1286.
- Hagan, J.J., Price, G.W., Jeffrey, P., Deeks, N.J., Stean, T., Piper, D., Smith, M.I., Upton, N., Medhurst, A.D., Middlemiss, D.N., Ryley, G.J., Lovell, P.J., Brodger, S.M., Thomas, D.R. (2000). Characterization of SB-269970-A, a selective 5-HT<sub>7</sub> receptor antagonist. *British Journal of Pharmacology*. 130(1):539-548.
- Havelock, J.C., Rainey, W.E., Carr, B.R. (2004). Ovarian granulosa cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 228(1):67-78.





- Hedlund, P.B. (2009). The 5-HT<sub>7</sub> receptor and disorders of the nervous system: an overview. *Psychopharmacology*. 206(3):345-354.
- Heidmann, D.E., Metcalf, M.A., Kohen, R., Hamblin, M.W. (1997). For 5-Hydroxytryptamine<sub>7</sub> (5-HT<sub>7</sub>) Receptor isoforms in human and rat produced by alternative splicing: species differences due to altered intron-exon organization. *Journal of Neurochemistry*. 68(4):1372-1381.
- Heinz, L., Klaus, M., Lutz, H. (2010). *Farmacología: texto y atlas*. México Editorial Médica Panamericana. p. 118.
- Henriksen, R., Dizeyi, N., Abrahamsson, P. (2012). Expression of serotonin receptors 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1B</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> and 5-HT<sub>4</sub> in ovarian tumors. *Anticancer Research*. 32(1):1361-1366.
- Héry, M., Francois-Bellan, A., Héry, F., Deprez, P., Becquet, D. (1997). Serotonin directly stimulates luteinizing hormone releasing, hormone release from GTL-1 cells via 5-HT<sub>7</sub> receptors. *Endocrine* 7(1):61-265.
- Hillier, S.G. (2001). Gonadotrophic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular Cellular Endocrinology*. 179(1):39-46.
- Hoaki, N., Terao, T., Wang, Y., Goto, S., Tsuchiyama, K., Iwata, N. (2011). Biological aspect of hyperthymic temperament: light, sleep and serotonin. *Psychopharmacology*. 213(1):633-638.
- Hollander, B. (2015). *Neuropharmacology and toxicology of novel amphetamine-type stimulants*. Tesis academic. Institute of Biomedicine, Pharmacology. University of Helsinki. Finland.
- Hong, Y., Cho, M., Yuan, Y.C., Chen, S. (2008). Molecular basis for the interaction of four different classes of substrates and inhibitors with human aromatase. *Biochemistry Pharmacology*. 75(5):1161-1169.
- Hornun, J.P. (2010). 3-The Neuronatomy of the Serotonergic System. *Handbook of Behavioral Neuroscience*, 21(1)51-64.
- Hoyer, D., Martin, G.R. (1997). 5-HT receptor classification and nomenclature: towards a harmonization with the human genome. *Neuropharmacology*. 36(45):419-428.





- Hsu, S.Y., Lin, P., Hsueh, A.J. (1998). BOD (Bcl-2-related ovarian death gene) is an ovarian BH3 domain-containing proapoptotic Bcl-2 protein capable of dimerization with diverse antiapoptotic Bcl-2 members. *Molecular Endocrinology*. 12(9):1432-1440.
- Hu, J., Zhang, Z., Shen, W.J. Azhar, S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism*. 7:47.
- Hughes, J., F.M., Gorospe, W.C. (1991). Biochemical Identification of Apoptosis (Programmed Cell Death) in Granulosa Cells: Evidence for a Potential Mechanism Underlying Follicular Atresia. *Endocrinology*. 129(5):2415-2422.
- Hussein, M.R. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Oxford Journal*. 11(2):162-178.
- Iceta, E.R. (2008). *Caracterización del transportador de serotonina humano en células CaCO<sup>-2</sup>: Estudio de los mecanismos de regulación fisiológica*. Tesis de doctorado. Universidad de Zaragoza. España.
- Ira, S. (2011). *Fisiología Humana*. 12<sup>a</sup> Edición. México. Editorial Mc Graw Hill. pp. 190, 640 y 717-719.
- Irusta, G. (2008). Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. Buenos Aires Argentina.
- Irving, H.R., Tan, Y.Y., Tochon-Danguy, N., Liu, H., Chetty, N., Desmond, P.V., Pouton, C.W., Coupar, I.M. (2007). Comparison of 5-HT<sub>4</sub> and 5-HT<sub>7</sub> receptor expression and function in the circular muscle of the human colon. *Life Science*. 80(13):1198-1205.
- Jacobs, B.L., Azmitia, E.C. (1992). Structure and Function of the Brain Serotonin System. *Physiological Reviews*. 72(1):165-215.
- Jefferson, W.N., Course, J.F., Banks, E.P., Korach, K.S., Newbold, R.R. (2000). Expression of estrogen receptor  $\beta$  is developmentally regulated in reproductive tissues of male and female mice. *Biology of Reproduction* 62(2):310-317.





- Jiang, X., Liu, H., Chen, X., Chen, P. H., Fischer, D., Sriraman, V., He, X. (2012). Structure of follicle-stimulating hormone in complex with the entire ectodomain of its receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 109(31):12491-12496.
- Jordan, J. (2003). Apoptosis: muerte celular programada. *Revista Ámbito Farmacéutico, Bioquímica*. 22(6):77-93.
- Jorgensen, H.S. (2007). Studies on the neuroendocrine role of serotonin. *Danish Medical Bulletin*. 54(1):266-288.
- Justo, S.N., Rossano, G.L., Szwarefarb, 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(1):38-386.
- Khalmuratovaa, R., Hahb, Y.S., Ahna, S.K., Jeona, S. Y., Kima, J.P., Balaban, C.D. (2010). Immunohistochemical and biomolecular identification of 5-HT<sub>7</sub> receptor in rat vestibular nuclei. *Journal of Vestibular Research*. 20(6):401-406.
- Kim, H.S., Yumkham, S., Choi, J.H., Son, G.H., Kim, K., Ryu, S.H., Suh, P.G. (2006). Serotonin stimulates GnRH secretion through the c-Src-PLC  $\gamma$ 1 pathway in GT1-7 hypothalamic cells. *Journal of endocrinology*. 190(3):581-591.
- Kim, J.M., Yoon, Y.D., Tsang, Y.B.K. (1999). Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology*. 140(1):2307-2317.
- Kim, J.M., Yoon, Y.D., Tsang, Y.B.K. (1999). Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. *Endocrinology*. 140(5)2307-2317.
- Kimura, S., Matsumoto, T., Matsuyama, R., Shiina, H., Sato, T., Takeyama, K. Kato, S. (2007). Androgen receptor function in folliculogenesis and its clinical implication in premature ovarian failure. *Trends in Endocrinology and Metabolism* 18 (5):183-189.
- Knobil, E., Neill, J.D. (2006). *Knobil and Neill's physiology of reproduction* Gulf Professional Publishing. México. Elsevier Academic Press Publications (Vol. 2).





- Kobe, F., Guseva, D., Jensen, T.P., (2012). 5-HT<sub>7</sub>R/G<sub>12</sub> signaling regulates neuronal morphology and function in an age-dependent manner. *Journal Neurosciences*. 32(1):2915–2930.
- Kolesnick, R., Fuks, Z. (2003). Radiation and ceramide-induced apoptosis. *Oncogene*. 22(37):5897-5906.
- Kolesnick, R.N. (1991). Sphingomyelin and derivatives as cellular signals. *Progress in Lipid Research*. 30(1):1-38.
- Koppan, M., Bodis, J, Verzar, Z., Tinneberg, H.R., Torok, A. (2004). Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system. *Endocrine*; 24(2):155–159.
- Krege, J.H., Hodgkin, J.B., Couse, J.F., Enmark, E., Warner, M., Mahler, J.F., Sar, M., Korach, K.S., Gustafsson, J.A., Smithies, O. (1998). Generation and reproductive phenotypes of mice lacking estrogen receptors  $\beta$ . *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 95(26):15677-15682.
- Kronenberg, H.M., (2009). *Tratado de endocrinología*, 11ª Edición. España. Editorial Elsevier. p. 136.
- Kruk, Z.L., Pycock, C. (1991). *Neurotransmitters and Drugs*. 3ª Edition. U.S.A. Editorial Chapman & Hall Dalla. p. 216.
- Lala, P. (2004). Suppression of human cytochrome P450 aromatase activity by monoclonal and recombinant antibody fragments and identification of their stable antigenic complex. *Journal Steroid Biochemical Molecular Biology*. 88(3):235-245.
- Leão, R.B.F., & Esteves, S.C. (2014). Gonadotropin therapy in assisted reproduction: an evolutionary perspective from biologics to biotech. *Clinics*. 69(4):279-293.
- Lebbe, M., Woodruff T.K. (2013). Involvement of androgens in ovarian health and disease. *Molecular Human Reproduction* 19 (3):828–837.
- Lesch, K.P. (2000). *Molecular biology, pharmacology and genetics of the serotonin transporter: psychobiological and clinical implications*. In Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS Springer Berlin Heidelberg. México pp. 671-705.





- Levinthal, C.F. (2013). Chapter 4: The major stimulants: Cocaine and amphetamines. En: *Drugs, Behavior and modern society. U.S.A. Pearson College Division*. pp. 86-109.
- 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(1):415-421.
- Lingjaerde, O. (2013). The kinetics of serotonin efflux from human blood platelets, and how different drugs in vivo and in vitro influence it. In *Recent Advances in Neuropsychopharmacology: Selected Papers from the 12th Congress of the Collegium Internationale Neuro-Psychopharmacologicum, Göteborg*. Elsevier. 31(1):158-161.
- Lizarbe, M.A. (2007). El suicidio y muerte celular. *Revista Real Academia de Ciencias Exactas Físicas y Naturales*. 101(2):93-100.
- Lorenzo, P. Lizasoain, I. (2003). Características farmacológicas de las drogas recreativas (MDMA y otras anfetaminas, Ketamina, GHB, LSD y otros alucinógenos. *Adicciones*. 15:51-75.
- 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(1):353-360.
- Lullman, H., Mohr, K., Hein, L. (2010). *Farmacología: texto y Atlas*. 6ª Edición. España. Editorial Médica Panamericana. p. 116.
- Maekawa, F., Tsukahara, S., Tsukamura, H., Maeda K.I., Yamanouchi, K. (1999). Prevention of inhibitory effect of dorsal raphe nucleus lesions on ovulation and LH surge by 5-HT<sub>2A/2C</sub> receptor agonists in female rats. *Neuroscience*. 35(4):291-298.
- Magoffin, D.A. (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. 37(1):1344-1349.
- Manzana, E.J.P., Chen, W.A. Champney, T.H. (2001). Acute melatonin and para-Chloroamphetamine interactions on pineal brain and serum serotonin levels as well as stress hormone levels. *Brain Research*. 909(1):127-137.





- Markström, E., Svensson, E., Shao, R., Svanberg, B., Billig, H. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis dependence on follicle differentiation. *Reproduction*. 123(1):23-30.
- Martínez, M., Aguilar, A. Rubio, G. (2002). *Manual de drogodependencia para enfermería*. México. Ediciones Socidrogalcohol. pp. 165-166.
- Marvin, E., Scrogin, K., Dudás, B. (2010). Morphology and distribution of neurons expressing serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptors in the rat hypothalamus and the surrounding diencephalic and telencephalic areas. *Journal of Chemical Neuroanatomy*. 39(4):235-241.
- Matsuda-Minehata, F., Inoue, N. Goto, Y., Manabe, N. (2006). The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. *Journal of Reproduction Development*. 52(25):695-705.
- Matsuda-Minehata, F., Inoue, N., Manabe, N., Ohkura, S. (2012). Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. *Journal of Reproduction and Development*. 58(1):44-50.
- Matthew, N.L. Bruce, M.K. & Bruce, A.S. (2006). *Berne and Levy Physiology*. 6<sup>a</sup> Edition. España. Editorial Elsevier. pp. 58-63
- Mayerhofer, A., Dissen, G.A., Costa, M.E., Ojeda, S.R. (1997). A role for neurotransmitter in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*. 138(1):3320-3329.
- McGeen, E.A., Hsueh, A.L. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinology Reviews*. 21(2):200-214.
- Mendog, G., Cortes, R., Vilaro, M.T., Hoyer, D. (2010). Chapter 1.6: *Distributions of 5-HT receptors in the central nervous system*. En: *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*. España. Editorial Elsevier. p. 123-138.
- Mendoza, P.N. (2008). *Farmacología médica*. México. Editorial Médica Panamericana. p. 411.
- Meneses, A. (2014). En: *The role of 5-HT System on memory and dysfunctional memory*. U.S.A. Editors Academic Press. pp. 53-64.





- Mercado, C.P., Kilic, F. (2010). Molecular mechanisms of SERT in platelets: regulation of plasma serotonin levels. *Molecular interventions Journal*. 10(4):231.
- Moguilevsky, J.A., Wuttke, W. (2001). Change in the control of gonadotropin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*. 109(1):188-195.
- Mohammad-Zadeh, I.F., Moses, I., Gwaltney-Brant, S.M. (2008). Serotonin: a review. *Journal Veterinary and Pharmacology. Therapy*. 31(1):187-199.
- Monroy, J., Ayala, M.E., Chavira, R., Damián-Matsumura, P. Domínguez, R. (2003). Comparative effects of injecting five, 6-dihydroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty. *Brain Research Bulletin*. 60(3):307-315.
- Monti, J.M. (2011). Serotonin control of sleep-wake behavior. *Sleep Medicine Reviews*. 15(1):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 dynamics in female rat offspring. *Reproductive Sciences*. 22(1):1297-1311.
- Morales, T.M. (2010). Efecto de la lesión química del núcleo dorsal del rafe en la apoptosis en el testículo y en la secreción de LH y testosterona en la rata macho prepúber. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. U.N.A.M. México.
- Morán, M.J., Ayala, M.E., Gallegos, E., Romero, J., Chavira, R. Damian-Matsumura, P. (2013). Effects of systemic administration or intrabursal injection of serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in rats. *Reproduction Fertility and Development*. 25(1):1105-14.
- Muñoz, C.H., Vargas, R.A. (2004). Síndrome serotoninérgico. *Revista Médica de la Universidad Militar de Nueva Granda*. 7:144-150.
- Murray, R.K., Granner, D.K., Rodwell, V.W. (2007). *Hapter Bioquímica Ilustrada*. 17ª Edición. México. Editores Manual Moderno. p. 487.
- Nandam, L.S., Jhaveri, D., Bartlett, P. (2007). 5-HT<sub>7</sub>, neurogenesis and antidepressants: a promising therapeutic axis for treating depression. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*. 34(5-6):546-551.





- Naval, J., Marzo, I., Anel, A. (2004). Mecanismos celulares de muerte celular programada. *Hematological*. 89(1):126-148.
- Nichols, D.E., Nichols, C.D. (2008). Serotonin Receptors. *Chemical Reviews*. 108(1):1614-1641.
- Norgahl, E.D., Salo, R. Leamon, M. (2003). Neuropsychological effects of chronic methamphetamine use on neurotransmitters and cognition: *The Journal of Neuropsychiatry and Clinical Neurosciences*. 15(3):317-325.
- Nussey, S.S, Whitehead, S.A. (2001). *Endocrinology in integrated approach*. 2ª Edition. U.K. Editors Taylor and Francis Group. pp. 63-65.
- Obeid, L.M., Linardic, C.M., Karolak, L.A., Hannun, Y.A. (1993). Programmed cell death induced by ceramide. *Science*. 259(5102):1769-1771.
- Orsi, N.M., Baskind, N.E., Cummings, M. (2014). *Anatomy, development, histology, and normal function of the ovary*. In *Pathology of the ovary, fallopian tube and peritoneum*. England. Editor Springer. pp. 1-32.
- Pai V.P., Hernandez L.L., Stull M.A., Horseman N.D. (2014). The Type 7 Serotonin Receptor, 5-HT<sub>7</sub>, Is Essential in the Mammary Gland for Regulation of Mammary Epithelial Structure and Function. *BioMed Research International*. 10(1):1-8.
- Pai, V.P., Hernandez, L.L., Stull, M.A., Horseman, N.D. (2015). The type 7 serotonin receptor 5-HT<sub>7</sub>, is essential in the mammary gland for regulation of mammary epithelial structure and function. *BioMed Research International*.
- Parkes, A.S. (2013). Androgenic activity of the ovary. In *Recent Progress in Hormone Research: The Proceedings of the Laurentian Hormone Conference Academic*. Press. p. 101.
- Peitsch, M.C., Polzar, B., Stephan, H., Crompton, T., MacDonald, H.R., Mannherz, H.G., Tschopp, J. (1993). Characterization of the endogenous deoxyribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis. *The EMBO Journal*. 12(1):371-380.
- Pentikainen, V. (2002). Regulation of male germ cell apoptosis: roles of sex steroids and the cellular death receptors Fas and TNFR1. Editors Helsinki University Biomedical Dissertations N° 13. University of Helsinki, Finland. pp. 21-24.





- Pérez, C.J. (2006). Efectos del bloqueo del sistema serotoninérgico en la modulación de las funciones del testículo de la rata macho prepúber. Tesis de licenciatura. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. U.N.A.M. México.
- Pérez-García, G., Salmerón, G.L. Meneses, A. (2006). Receptores serotoninérgicos y memoria. *Revista Mexicana de Análisis de la Conducta*. 32(2):241-269.
- Ponimaskin, E.G., Profirovic, J., Vaiskunaite, R., Richter, D.W., Voyno-Yasenetskaya, T.A. (2002). 5-Hydroxytryptamine 4(a) receptor is coupled to the Galpha subunit of heterotrimeric G<sub>13</sub> protein. *Journal of Biology Chemistry*. 277(1):20812–20819.
- Prange, J., Schmutterer, T., Fester, L., Zhou, L., Imholz, P., Brandt, N., Vierk, R., Jarry, H., Rune, G. (2013). Endocrine regulation of estrogen synthesis in the hippocampus? *Progress in Histochemistry and Citochemistry*. 48(1):49-64.
- Prieto, G.B., Velázquez, P.M. (2002). Monografía fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. *Departamento de Fisiología, Facultad de Medicina, UNAM*. 45(1):252-257.
- Prizant, H., Gleicher, N., Sen, A. (2014). Androgen actions in the ovary: balance is key. *Journal of Endocrinology*. 222(3):141-151.
- Pytliak, M., Vargova, V., Mechirova, V., Felsoci, M. (2011). Serotonin receptors- From molecular biology to clinical applications. *Journal of physiology Research*. 60(1):15-25.
- Rang H.P., Dale, M.M., Riter J.M., 6+Moore P.K., (2004). *Farmacología*. Editorial Elsevier. 5ª Edición. España. p. 184-188.
- Raviña, E. (2008). *Medicamentos, un viaje a lo largo de la evolución histórica del descubrimiento de fármacos*. España. Editorial Universidad Santiago de Compostela. p.554.
- Ray, W.F. (1992). Effects of p-Chloroamphetamine on brain serotonin neurons. *Journal of Neurochemistry*. 17(5):449-456.
- Richards, J.S., Jahnsen, T.O.R.E., Hedin, L.A.R.S., Lifka, J.A.M.I., Ratoosh, S.H.E.R.I., Rurica, J.M., Goldring, N.B. (2013). Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Progress in Hormone*. 43 (1):231-276.
- Robledo, P. (2008). Las Anfetaminas, Trastornos Adictivos. *Universidad Pompeu Fabra e IMIM*. 10(3):166-174.





- Roiser, J.P., Rogers, R.D. Sahakian, B.J. (2007). Neuropsychological function in ecstasy users: a study controlling for polydrug use. *Psychopharmacology*. 189(4):505-516.
- Roos, M. Wojciech, P. (2007). *Histología*. México. Editorial Médica Panamericana. pp. 828-835.
- Rosales, A.M. Guzmán, A. (2008). Apoptosis in follicular atresia and luteal regresión. *Técnicas Pecuarias en México*. 46(1):159-182.
- Rosenfeld, C.S., Wagner, J.S., Roberts, M.R., Lubahn, J. (2001). Intraovarian actions of estrogen. *Reproduction*. 122(1):215-226.
- Rowland, P. (2006). Crystal structure of human cytochrome P450 2D6. *Journal Biology Chemical*. 281(1):7614-7622.
- Ruat, M., Traiffort, E., Leurs, R., Tardivel-Lacombe, J., Diaz, J., Arrang, J.M., Schwartz, J.C., (1993). Molecular cloning, characterization, and localization of a high-affinity serotonin receptor (5-HT<sub>7</sub>) activating cAMP formation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 90(1):8547-8551.
- Ruwanpura, S.M., McLachlan, R.I., Meachem, S.J. (2010). Hormonal regulation of male germ cell development. *Journal of Endocrinology*. 205(2):117-131.
- Sánchez, F., Smitz J. (2012). Molecular control of oogenesis. *Biochemical et Biophysical Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 1896(2):1896-1912.
- Sánchez-López, A., Centurión, D., Lozano-Cuenca, J., Muñoz-Islas, E., Cobos-Puc, L. E., Villalon, C.M. (2009). Receptores de la serotonina que inhiben el tono simpático vasopresor en la rata descerebrada y desmedulada. *Archivos de cardiología de México*. 79(2):83-94.
- Sánchez-Torres, L. Diosdad, F. (2003). Apoptosis: el fenómeno y su determinación. *Revista Técnica Pecuaria*. 41(1):49-62.
- Sanders-Bush, E., Bushing, J.A. Sulser, F. (1975). Long-term effects of p-Chloroamphetamine and related drugs on central serotonergic mechanisms. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 192(1):33-41.
- Schatzberg, A.F., Nemeroff, C.B. (2006). Tratado de psicofarmacología. España. Editorial Elsevier. p. 84





- Scott, J.C., Steven, P.W., Meyer, R.A., Heaton, R.K., Akinson, H. Grant, I. (2007). Neurocognitive effects of methamphetamine: A critical Review and Meta-analysis. *Neuropsychology*. 17(3):275-297.
- Shaha, C., Tripathi, R., Mishra, D.P. (2010). Male germ cell apoptosis: regulation and biology. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London B: Biological Sciences*. 365(1546):1501-1515.
- , A. Abu-Amara, A., Aldayry, C., Hagan, J.J., Willson, C. (2004). 5-HT<sub>7</sub> receptor subtype as a mediator of the serotonergic regulation of luteinizing hormone release in the zone incerta. *Journal of Pharmacology*. 491(1):77-84.
- Siegel, G., Agranoff, B., Wayne, R., Fisher, S. Uhler, M. (1999). Basic neurochemistry. Molecular, cellular and medical aspects. Lippincott Williams & Wilkins. Philadelphia. 6:1183-1190.
- Silbernagl, S. (2009). *Fisiología: texto y atlas*. 7° Edition. México. Editorial Médica Panamericana. pp. 268-307.
- Simpson, E.R. (1994). Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocrinology*. 15(1):342-355.
- Simpson, E.R., Clyne, C., Rubin, G., Boon, W.C., Robertson, K., Britt, K., Jones, M. (2002). Aromatase-a brief overview. *Annual Review of Physiology*. 64(1):93-127.
- Simpson, E.R., Davis, S.R. (2001). Minireview: aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis some new perspectives. *Endocrinology*. 142(11):4589-4594.
- Sirotkin, A., Schaeffer H., (1997). Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. *Journal of Endocrinology*. 152(1):1-5.
- Sirotkin, A.V. (1995). Serotonin influences hormone and cyclic nucleotide release by granulosa cells isolated from porcine ovaries. *Biogenic Amines*; 11(2):137-146.
- Sirotkin, A.V., Mertin, D., Süvegová, K., Lauričik, J., Morovič, M., Harrath, A.H., Kotwica, J. (2016). Mink aging is associated with a reduction in ovarian hormone release and the response to FSH and ghrelin. *Theriogenology*. 86(5):1175-1181.
- Sleight, A.J., Carolo, C., Petit, N., Zwingelstein, C., Bourson, A. (1995). Identification of 5-Hydroxytryptamine receptor Binding sites in rat hypothalamus: Sensitivity to chronic antidepressant treatment. *Molecular Pharmacology* 47(99):103-110.





- Smith, M.J., Jennes, L. (2001). Neural signal that regulate GnRH neurons directly during the estrous cycle. *Reproduction*. 122(1):1-10.
- Smythe, G. (1977). El papel de la serotonina y la dopamina en hipotálamo-hipófisis función. *Clinical Endocrinology*. 7(4):325-341.
- Speroff, L. (1999). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*. 6<sup>a</sup> Edición. Mexico. Editorial Mc Graw. pp. 264-289.
- Sprague, J.E., Johnson, M.P., Schmidt, C.J., Nichols, D.E. (1996) studies on the mechanism of p-Chloroamphetamine neurotoxicity. *Biochemical Pharmacology*. 52(1):1271-1277.
- Steinbusch, H.W., M., Nieuwenhuys, R. (1981). Localization of serotonin-like immunoreactivity in the central nervous system and pituitary of the rat, with special references to the innervation of the hypothalamus. In *Serotonin*. Springer US. pp. 7-35.
- Stener, E., Fujisawa, S., Kurosawa, M. (2006) Ovarian blood flow responses to electroacupuncture stimulation depend on estrous cycle and on site and frequency of stimulation in anaesthetized rats. *Journal of applied Physiology*. 101(1):84-91.
- Steranka, L.R., Sanders-Bush, E. (1978). Long-term reduction of brain serotonin by p-chloroamphetamine: effects of inducers and inhibitors of drug metabolism. *Pharmacology*. 206(2):460-467.
- Stiedl, O., Pappa, E., Konradsson-Geuken, Å., & Ögren, S.O. (2015). The role of the serotonin receptor subtypes 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>7</sub> and its interaction in emotional learning and memory. *Frontiers in Pharmacology*. 6(162):162-169.
- Sulzer, D., Sonders, M.S., Poulsen, N.W., Galli, P.G. (2005). Mechanisms of neurotransmitter release by amphetamines. *Progress in Neurobiology*. 75(1):406-433.
- Tanaka, E., Baba, N., Toshida, K., Suzuki, K. (1993). Serotonin times steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptor. *Life Sciences*. 53(7):563-570.
- Terranova, P.F., Uilenbroek, T.J., Saville, L., Horst, D., Nakamura, Y. (1990) Serotonin enhances o estradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro:





- effects of experimentally induced atresia. *Journal Endocrinology*. 125(3):433–438.
- Tesguerras, A.F., Castillo, C. (2000). *Fisiología del sistema endocrino*. México. Editorial McGraw Hill. pp. 1015-1044.
- Thomas, S., Leeson, C., Ronald, L. Antony, A.P. (1998). *Texto de atlas de histología*. México. Editorial Panamericana pp. 600-608.
- Thompson, E.A. Siiteri, P.K. (1974). Utilization of oxygen and reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate by human placental microsomes during aromatization of androstenedione. *Journal of Biology Chemical*. 249(1):5364-5372.
- Tilly, J.L. (1996). Apoptosis and ovarian function. *Reviews in Reproduction*. 1(3):162-172.
- Tinajero, J.C., Fabbri, A., Ciocca, R. D., Dufau, L.M. (1993). Serotonin secretion from relending cells. *Endocrinology*. 128(1):3026-3029.
- Torres, A.M.R., Sánchez, A.G. (2012). Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*. 46(2):159-182.
- Tortora G.J., Grabowski S.R. (1999). *Principles of Anatomy and Physiology, Illustrated Notebook*. U.S.A. Editorial Wiley. p. 588.
- Tortora, G.J., Derrickson, B. (2006). *Principio de anatomía y Fisiología*. 11ª Edición. México. Editorial Panamericana. pp. 629, 1077-1080.
- Trueta, C., Cercós, G. (2012). Regulación de la liberación de serotonina en distintos compartimientos neuronales. *Salud Mental*. 35(5):435-443.
- Tsonis, C.G., Carson, R.S., Findlay, J.K. (1984). Relationships between aromatase activity, follicular fluid estradiol-17 $\beta$  and testosterone concentrations, and diameter and atresia of individual ovine follicles. *Journal of Reproduction and Fertility*. 72(1):153-163.
- Uchida, S., Kagitani, F., Hotta, H., Hanada, T., Aikawa, Y. (2005). Cutaneous mechanical stimulation regulates ovarian blood flow via activation of spinal and supraespal reflex pathways in anesthetized rats. *The Japanese Journal of Physiology*. 55(1):265-277.





- Ullmer, C., Schmuck, K., Kalkman, H.O., Lubertt, H. (1995). Expression of serotonin receptor mRNAs in blood vessels. *FEBS Letters*. 370(1):215-221.
- Ulloa-Aguirre, A., Timossi C., (2000). Biochemical and functional aspects of gonadotropin-releasing hormone and gonadotropins. *Reproductive Biomedicine*. 1(2):48-62.
- Utrilla, P. (2000). Aspectos farmacológicos de las anfetaminas. *Revista de la Universidad de Granada*. 41(1):67- 77.
- Vanderhyden, B.C., Cohen, J.N., Morley, P. (1993). Mouse oocyte regulate granulosa cell steroidogenesis. *Endocrinology*. 133(1):423-426.
- Vanderhyden, B.C., Telfer, E.E., Eppig, JJ. (1992). Mouse oocytes promote proliferation of granulosa cells from preantral and antral follicles in vitro. *Biology of Reproduction*. 46(6):1196-1204.
- Vanderhyden, B.C., Tonary, A.M. (1995). Differential regulation of progesterone and estradiol production by mouse cumulus and mural granulosa cells by a factor(s) secreted by the oocyte. *Biology of Reproduction*. 53(6):1243-1250.
- Vecelá, J., Reháč, P., Mihalik, J., Czikkova, S., Pokorný, J., Koopel J. (2003). Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preinplantation embryos. *Physiology*. 52(2):223-228.
- Vega, M. (1997). Bases Biológicas de la Función Ovárica. Chile. Editor *Serie Científica Básica, Centro de Extensión Biomédica Universidad de Chile*. pp. 187-199.
- Vera, D.K.S. (2005). *Neurobiología de la depresión mayor y de su tratamiento farmacológico*. Tesis de Maestría en Ciencias Fisiológicas. Universidad de Colima. México. pp. 17-21.
- Vitale, M.L., and Chiocchio, S.R. (1993) serotonin a neurotransmitter involved in the relation of luteinizing hormone release. *Endocrine Reviews*. 14(1):480-493.
- Vital-Reyes, V., Rodríguez-Burford, C., Chhieng, D.C., Alvarado-Cabrero, I., Reyes-Fuentes, A., Grizzle, W.E. (2006). Ovarian expression of markers associated with proliferation or apoptosis in women with diminished ovarian reserve. *Fertility and Sterility*. 86(1):176-185.



- Voronina, E., Lovasco, L. A., Gyuris, A., Baumgartner, R. A., Parlow, A. F., and Freiman, R. N. (2007). Ovarian granulosa cell survival and proliferation requires the gonad-selective TFIIID subunit TAF4b. *Developmental Biology* 303(2):715–726.
- Wada, K., Hu, L., Mores, N., Navarro, C.E., Fuda, H., Krsmanovic, L.Z., Catt, K.J. (2006). Serotonin (5-HT) receptor subtypes mediate specific modes of 5-HT-induced signaling and regulation of neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Molecular Endocrinology*. 20(1):125-135.
- Welford, R.W., Vercauteren, M., Trébaul, A., Cattaneo, C., Eckert, D., Garzotti, M., Nayler, O. (2016). Serotonin biosynthesis as a predictive marker of serotonin pharmacodynamics and disease-induced dysregulation. *Scientific Reports*. 6(1):115-123.
- Welsh, U., Deller, T.S. (2014). *Histología*. 3ª. Edición. México. Editorial Médica Panamericana. p. 507.
- Whitaker-Azmitia, P.M. (2001). Serotonin and brain development: Role in human developmental diseases. *Brain Research Bulletin*. 56(1):479-485.
- William L. Duax, (2012). *Atlas of Steroid Structure*. U.S.A. Editorial Springer Science & Business Media. p. 4.
- William, M.N. (2009). *The amphetamine years: a study of the medical applications and extramedical consumption of psychostimulant drugs in the postwar United States*. Tesis de doctorado. Georgia Institute of Technology. USA. pp. 1945-1980.
- Yen, S.S.C., Jaffe, R.B., Barbieri, R.L. (2001). *Endocrinología de la reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4ª Edición. Argentina. Editorial Médica Panamericana. pp. 165-199.
- Young, J.M., McNeilly, A.S. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. *Reproduction*. 140(4):489-504.
- Zhao, P.L., Zhang, Q.F., Yan, L.Y., Huang, S., Chen, Y., Qiao, J. (2014). Functional investigation on aromatase in endometrial hyperplasia in polycystic ovary syndrome cases. *Asocian Pacific Journal Cáncer Prevention*. 15(29):8975-8979.

<http://www.rae.es/>



## Publicaciones



# LVIII CONGRESO NACIONAL SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.

San Miguel de Allende, Guanajuato

del 6 al 10 de septiembre de 2015

### TEMAS:

- Biofísica
- Biología Celular y Bioquímica
- Cardiovascular y sistema muscular
- Desarrollo
- Endocrinología y Homeostasis
- Farmacología
- Genómica
- Inmunología y Hematología
- Métodos, técnicas e instrumentación
- Morfología
- Neurociencias
- Nutrición, metabolismo y obesidad
- Sueño, y Ritmos Biológicos
- Patología Humana

#### COMITÉ ORGANIZADOR/ MESA DIRECTIVA:

**Dra. Marcia Hiriart Urdanivia**  
Presidenta

**Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza**  
Vicepresidente

**Dr. Daniel Ortuño Sahagún**  
Secretario

**Dr. Benjamín Florán Garduño**  
Tesorero

#### Informes e inscripciones:

[www.smcf.org.mx](http://www.smcf.org.mx)

#### Dudas y aclaraciones:

[smcf2015@hotmail.com](mailto:smcf2015@hotmail.com)



# SMB XXXI

## CONGRESO NACIONAL DE BIOQUÍMICA

06 - 11 de Noviembre 2016  
**Aguascalientes**

Fecha límite de inscripciones y envío de resúmenes:  
**30 de junio**

Sede: Hotel Marriott

Comité Organizador  
Miguel Lara Flores  
Irene Castaño Navarro  
Guadalupe Espin  
Jorge Luis Folch

Correo: [nacional@smb.org.mx](mailto:nacional@smb.org.mx)

[www.smb.org.mx](http://www.smb.org.mx)