

50322
16



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"**

**PARTICIPACIÓN DE LA SEROTONINA EN EL PROCESO DE
APOPTOSIS Y ATRESIA FOLICULAR DURANTE EL DESARROLLO
PREPUBERAL DE LA RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G O

P R E S E N T A
ELOIR GALLEGOS PACHECO

DIRECTORA: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR



**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

MÉXICO, D.F.

2003

A



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"**

**PARTICIPACIÓN DE LA SEROTONINA EN EL PROCESO DE
APOPTOSIS Y ATRESIA FOLICULAR DURANTE EL
DESARROLLO PREPUBERAL DE LA RATA.**

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: Eloir Gallegos Pacheco

Directora de Tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

**Tesis realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción,
Laboratorio de Pubertad de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.**

**Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA
clave 210500.**

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

B

"Yo pensaba que los personajes de las leyendas salían en busca de aventuras porque querían tenerlas, y les parecían excitantes, y en cambio la vida era un tanto aburrida: una especie de juego, por así decir. Pero con las historias que importaban de veras, o con esas que uno guarda en la memoria, no ocurría lo mismo. Se diría que los protagonistas se encontraban de pronto en medio de una aventura, y que casi siempre ya tenían los caminos trazados, como dice usted. Supongo que también ellos, como nosotros, tuvieron muchas veces la posibilidad de volverse atrás, solo que no la aprovecharon. Quizá, pues si la aprovecharan tampoco lo sabríamos, porque nadie se acordaría de ellos. Porque solo se habla de los que continuaron hasta el fin..."

J. R. R. Tolkien

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

C

Dedicatorias

A mis padres, Sergio y Gabriela por darme todo su cariño y apoyo incondicionalmente.

A mis hermanos Maribel y Hugo, por estar conmigo y saber que cuento con ellos.

A mis primos Miguel, José Luis e Ivonne, porque aunque estén lejos siempre cuento con ellos.

A mis abuelitos, porque siempre han estado conmigo y me han dado su cariño.

A toda mi familia, porque a pesar de no estar todos juntos siempre están pendientes de mi.

A Juanita, Miriam, Abel, Selene, Vicky y Sergio, por hacer mas fácil el trabajo brindándome siempre su amistad.

A mis amigos Flor, Lalo, Yadira, Miguel, Inés, Iván, Gris y las Claudias, por brindarme su amistad y mostrarme que vale la pena esforzarse para lograr lo que uno quiere.

Agradecimientos

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por todo el apoyo y la ayuda que me brindó para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. Patricia Rosas Saucedo

M. en IBSH Angélica Flores Ramírez

Biol. Marisela Valdez Ruiz

Por su valiosa contribución para la elaboración de esta tesis.

Al Biol. Andrés Aragón por toda su ayuda y colaboración para que este trabajo pudiera llevarse a cabo.

A Juanita por toda su ayuda, apoyo y particularmente por brindarme su amistad incondicional en todo momento.

A la Técnico María Luisa por su contribución para la realización de este trabajo y por darme su amistad.

A todas las personas que trabajan dentro de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por permitirme conocerlos y crear un inmejorable ambiente de trabajo.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

E

ÍNDICE

Abreviaturas utilizadas	I
Resumen	III
Introducción	1
Eje Hipotálamo-Hipófisis	3
Funciones del ovario	4
Foliculogénesis	5
Esteroidogénesis	8
Atresia	10
Apoptosis	11
Serotonina y Funciones del Ovario	20
Justificación	24
Hipótesis	25
Objetivos	25
Materiales y método	26
Resultados	30
Discusión	51
Conclusiones	60
Bibliografía	61
Apéndice	70

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Abreviaturas utilizadas

Abreviatura	Significado
5-HIAA	Ácido 5-hidroxiindol acético
5-IIT	5-hidroxitriptamina
ACTH	Hormona adrenocorticotrópica
ADN	Ácido desoxirribonucleico
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico
APAF-1	Factor activador de proteasa 1
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATP	Adenosin trifosfato
bax	Gen x asociado a bcl-2
bcl-2	Linfoma 2 de leucemia de células B
bcl-x	Gen x relacionado a bcl-2
bFGF	Factor de crecimiento fibroblástico básico
CAD	Caspasa activadora de la enzima DNAasa
DNAasa	Desoxirribonucleasa
EGF	Factor de crecimiento epidermal
FSH	Hormona estimulante del folículo
GDF-9	Factor de crecimiento y diferenciación-9
GDP	Guanosil difosfato
GH	Hormona del crecimiento
GMPc	Guanosil monofosfato cíclico
GnRH	Hormona liberadora de las gonadotropinas
GTP	Guanosil trifosfato
hCG	Gonadotropina coriónica humana
ICAD	Inhibidor de la caspasa activadora de la DNAasa
IGF-I	Factor de crecimiento parecido a la insulina

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

IL-1 β	Interleucina-1 β
KGF	Factor de crecimiento keranocítico
LH	Hormona luteinizante
PGF2 α	Prostaglandina F2 α
PMSG	Gonadotropina de suero de yegua preñada
PRL	Prolactina
TGF- α	Factor de crecimiento transformante- α

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Resumen

La serotonina participa en la regulación de la secreción de la GnRH y las gonadotropinas y en la gónada en la modulación de la producción de hormonas esteroideas sexuales y el flujo sanguíneo. En la rata, la estimulación del sistema serotoninérgico durante la etapa juvenil bloquea la ovulación en el día del primer estro vaginal. Por ello, en el presente estudio se analizó si la falta de ovulación en estos animales está asociada al incremento en el proceso de apoptosis ("muerte celular programada") que conduce a la atresia del folículo ovárico. Para ello se evaluó el proceso de apoptosis en el ovario de ratas tratadas con sulfato de serotonina por la técnica de TUNEL.

En los animales que recibieron sulfato de serotonina, la concentración de progesterona en animales sacrificados a los 35 y 37 días de edad fue significativamente menor que la de los animales testigo (35 días: 2.3 ± 1.3 vs. 12.3 ± 1.3 ; 37 días: 5.0 ± 1.0 vs. 15.2 ± 7.2 , $p < 0.05$). La concentración de testosterona fue menor en los animales sacrificados al día 35 de edad en relación al grupo testigo (8.0 ± 4.0 vs. 25.0 ± 6.0 , $p < 0.05$), mientras que en los que fueron sacrificados en el día 32 fue mayor en comparación con la del grupo testigo (24.0 ± 8.0 vs. 6.0 ± 1.0 , $p < 0.05$) y no se observaron diferencias significativas cuando los animales se sacrificaron a los 37 días de edad (15.0 ± 8.0 vs. 9.0 ± 7.0 , ns).

En los animales testigo la mayor incidencia de apoptosis se presentó en los folículos que se encontraban dentro del rango de tamaño de $200-400 \mu\text{m}$, lo cual posiblemente repercute en la selección de los folículos destinados a ovular. En los folículos de animales con estimulación del sistema serotoninérgico esta proporción se incrementó en comparación con la de los animales testigo en todas las edades estudiadas (32 días: 84.1% vs. 43.7% ; 35 días: 84.0% vs. 39.9% ; 37 días: 73.5% vs. 48.8% , $p < 0.05$), lo que explica la disminución en la proporción de folículos

preovulatorios sanos que pudieran llegar a liberar su ovocito, posiblemente como consecuencia de las modificaciones en la producción de hormonas esteroides.

Estos resultados nos permiten pensar que la serotonina participa en la regulación del crecimiento y la diferenciación de los folículos en el ovario (apoptosis y atresia folicular), tanto porque modula la secreción de gonadotropinas y que a nivel del propio ovario modula de manera inhibitoria su respuesta a las gonadotropinas, y como consecuencia en la producción de las hormonas esteroides sexuales.

TESIS CON
FALLA DE URGEN

INTRODUCCIÓN

El aparato reproductor de la hembra está conformado por los ovarios, los oviductos, el útero, la vagina y los genitales externos. Los ovarios son órganos pares que cumplen dos funciones interrelacionadas; producción de gametos (gametogénesis) y secreción de hormonas esteroides sexuales, inhibina, activina y folicostatina entre otros. La producción de los gametos por el ovario se denomina ovogénesis. Las principales hormonas esteroides sexuales producidas por los ovarios, son la progesterona, los andrógenos (testosterona) y los estrógenos (17β -estradiol) (Ross y col., 1997; Erickson y Shimasaki, 2001).

Los estrógenos estimulan el crecimiento y la maduración de los órganos sexuales internos y externos y son responsables de que se manifiesten las características sexuales secundarias. También actúan sobre las glándulas mamarias, donde estimulan su desarrollo mediante la inducción del crecimiento de los conductos, del estroma y la acumulación de tejido adiposo (Ham, 1985; Ross y col., 1997).

La progesterona prepara al útero para la preñez debido a que induce cambios secretores en el endometrio. Esta hormona también prepara a las glándulas mamarias para la lactancia, ya que induce la proliferación de las células que constituyen los lobulillos (Ham, 1985; Ross y col., 1997).

El ovario está conformado por dos regiones bien diferenciadas: la médula que se localiza en la porción central del ovario y contiene tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios noradrenérgicos y peptidérgicos que penetran y salen por el hilo del ovario. La corteza se encuentra en la periferia, alrededor de la médula, contiene los folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo incluidos en el tejido conectivo y la glándula intersticial. En el estroma

PAGINACIÓN DISCONTINUA

que rodea los folículos se encuentran fibras de músculo liso aisladas. El límite entre la médula y la corteza no está bien definido (Ham, 1985; Lesson, 1985; Boya, 1999).

Desde el punto de vista anatómico y funcional, en el ovario se distinguen tres compartimentos endócrinos: el folicular, el luteal o cuerpo lúteo y la glándula intersticial. El folículo es la unidad anatómica y funcional del ovario, a partir del cual se originan los otros dos compartimientos del órgano (figura 1) (Domínguez y col., 1991).

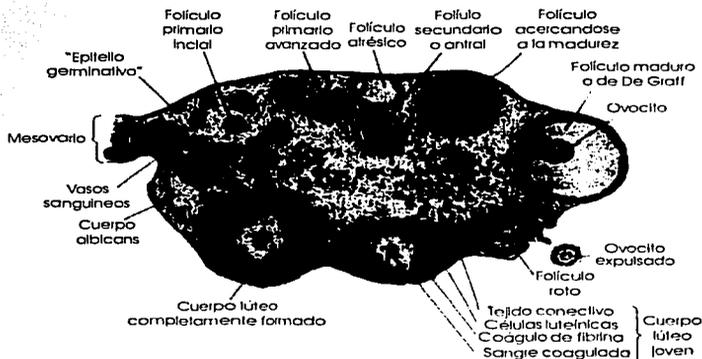


Figura 1. Corte transversal de ovario en el que se observa el desarrollo del folículo hasta la formación del cuerpo lúteo (Tomado de: Ross y col., 1997).

El funcionamiento del ovario es regulado por las hormonas secretadas en diferentes glándulas, entre ellas la hipófisis, que secreta la hormona estimulante del folículo, la hormona luteinizante, la prolactina, la hormona adrenocorticotrópica, y la hormona del crecimiento. El funcionamiento de la hipófisis es regulado

directamente por el hipotálamo por medio de hormonas peptídicas y neurotransmisores (Noback, 1984; Brown, 1994).

Eje Hipotálamo-Hipófisis

Anatómicamente la hipófisis se divide en adenohipófisis (derivado embrionario del ectodermo oral) y neurohipófisis (derivado del ectodermo neural). La adenohipófisis consta de la *pars tuberalis* o parte anterior, y la *pars intermedia* o parte intermedia. La neurohipófisis comprende el tronco infundibular, y la *pars nervosa* (Noback, 1984; Domínguez y col., 1991).

El hipotálamo regula la secreción de las hormonas hipofisarias, y la actividad de otras glándulas endocrinas. Esta regulación se hace a través de vías nerviosas hacia la *pars nervosa* (porción distal de la neurohipófisis), y por la combinación de una vía neural y una ruta vascular hacia la adenohipófisis (tracto tuberoinfundibular y sistema portahipofisiario). Así mismo, los centros hipotalámicos son regulados por otras estructuras del sistema nervioso y por interacciones recíprocas con otras estructuras periféricas, como las gónadas (Noback, 1984; Brown, 1994).

El hipotálamo contiene grupos de somas neuronales que constituyen los núcleos hipotalámicos los cuales secretan un conjunto de factores u hormonas liberadoras o inhibitoras que modulan la producción de las hormonas adenohipofisarias. La secreción de estos factores hipotalámicos es regulada por las hormonas de origen gonadal (Noback, 1984; Brown, 1994).

Las funciones del ovario son reguladas 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. Así mismo, la liberación de la GnRH es regulada por los

neurotransmisores y neuropéptidos, algunos de los cuales interactúan entre ellos o con los esteroides gonadales. La GnRH es sintetizada en neuronas denominadas GnRHérgicas que se localizan en el área preóptica del hipotálamo anterior y en el área medio basal (Brown,1994).

Funciones del ovario

El proceso de foliculogénesis es regulado por diferentes hormonas, tanto de origen ovárico (esteroides) como adenohipofisiario [FSH, LH, PRL y la GH]. La FSH y LH regulan la foliculogénesis y la esteroidogénesis, así como la ovulación (Hirshfield, 1991; Greenwald y Roy, 1994; Domínguez y col., 1991).

La FSH estimula directamente la proliferación de las células de la granulosa y la secreción de los estrógenos por estas células. Sin embargo, la producción de las hormonas esteroides sexuales por el folículo también depende de la acción de la LH (Greenwald y Roy, 1994).

Conforme el folículo se desarrolla y las células de la granulosa se diferencian, éstas adquieren receptores para la FSH, incrementa la actividad mitótica de las células de la granulosa, se inicia la formación de una cavidad entre estas células, que se denomina antro folicular, y se acumula líquido en éste. Durante el crecimiento del folículo, las células adquieren también los receptores para la LH y se inicia la síntesis de la enzima aromatasas que transforma a los andrógenos en estrógenos (Greenwald y Roy, 1994; Domínguez y col., 1991).

Además de las gonadotropinas, el desarrollo y la maduración del folículo es un proceso regulado por la PRL y la GH. Estas hormonas estimulan la expresión de los receptores a la LH en las células de la granulosa (Greenwald y Roy, 1994).

Foliculogénesis

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El proceso de foliculogénesis es un evento gradual, en el que se lleva a cabo la organización, diferenciación y maduración del folículo ovárico. Se inicia con la formación de un folículo primordial, el cual posteriormente se convierte en un folículo en crecimiento y por último en un folículo maduro o de De Graff. Dependiendo del número de capas de células de la granulosa que constituyen al folículo en crecimiento éstos se clasifican en primarios y secundarios (Ross, 1997; Castro, 1999; Erickson y Shimasaki, 2001).

En el ovario la mayoría de los folículos son primordiales y están incluidos en la corteza ovárica, por debajo de la túnica albugínea. Un folículo primordial se compone de un ovocito y una capa circundante de células epiteliales aplanadas, las células foliculares. El ovocito es una célula grande, redonda, con un núcleo bien definido (Ross, 1997).

Cuando se inicia la maduración del folículo primordial éste se transforma primero en un folículo primario en crecimiento, que se caracteriza por el aumento de tamaño del ovocito y las células foliculares aplanadas crecen y adquieren forma cúbica y posteriormente cilíndrica. Estas células, que se denominan células de la granulosa, proliferan por división mitótica. Las células de la granulosa están separadas del tejido conectivo que las rodea por una membrana basal. Durante el crecimiento del ovocito se forma una gruesa membrana eosinófila, la zona pelúcida, que separa el ovocito de las células de la granulosa circundantes (figura 2) (Geneser, 2000).

Cuando el folículo tiene un tamaño de aproximadamente 200 μm de diámetro, en la capa de células de la granulosa aparece el antro folicular. El folículo con un antro bien formado se denomina folículo secundario. Posteriormente, el ovocito ocupa una posición excéntrica, rodeado por células de la granulosa que

conforman el *cumulus ooforus* (figura 2). Alrededor de las células de la granulosa se encuentra una capa de células denominada teca folicular. Esta capa de células se diferencia entonces en una región interna y una externa, y son irrigadas por una gran cantidad de vasos sanguíneos (Ham, 1985; Ross, 1997; Geneser, 2000).

El tamaño del folículo aumenta en los días previos a la ovulación, como consecuencia de la acumulación del líquido en el antró. Posteriormente se separan las células de la parte basal del *cumulus ooforus* y, poco antes de la ovulación, el ovocito queda suelto en el líquido folicular, rodeado por la zona pelúcida y una capa de células de la granulosa, que adoptan una orientación radial, por lo que se denominan corona radiada (figura 2) (Lesson, 1985; Ross, 1997; Geneser, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

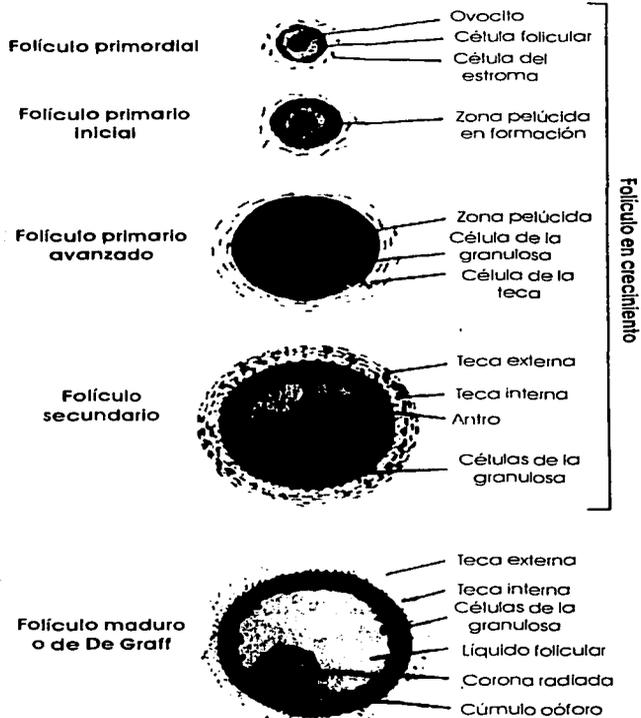


Figura 2. Folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo; folículo primordial, en crecimiento y maduro o de De Graff (Tomado de: Ross y col., 1997).

Esteroidogénesis

Durante el desarrollo del folículo, éste adquiere la capacidad de sintetizar estrógenos, progesterona y testosterona. En la síntesis de los estrógenos participan dos células del folículo, la célula tecointersticial y la célula de la granulosa. En las células de la teca interna, el colesterol es transformado a progesterona, la cual posteriormente puede ser transformada a andrógenos (androstenediona o testosterona o ambas). La LH al unirse a su receptor de membrana activa a las proteínas G y estimula la formación de adenosin monofosfato cíclico en la célula de la teca y desencadena la cascada de eventos que conducen a la activación de la enzima P450_{scc} y P450_{17 α} que están involucradas en la transformación de colesterol en progesterona y andrógenos respectivamente. Los andrógenos se difunden y se incorporan al citoplasma de las células de la granulosa y posteriormente a los microsomas, donde son aromatizados a estrógenos. Estas hormonas actúan en el propio folículo y también difunden a la circulación general. La transformación de andrógenos a estrógenos en las células de la granulosa es estimulada por la FSH. La FSH actúa vía receptores de superficie acoplados a proteínas G, las cuales activan al adenilato ciclasa para producir AMPc. El AMPc es una molécula que actúa como segundo mensajero, y estimula la actividad de la enzima aromatasa que convierte la androstenediona a estrógenos (figura 3) (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Erickson y Shimasaki, 2001).

Célula de la teca

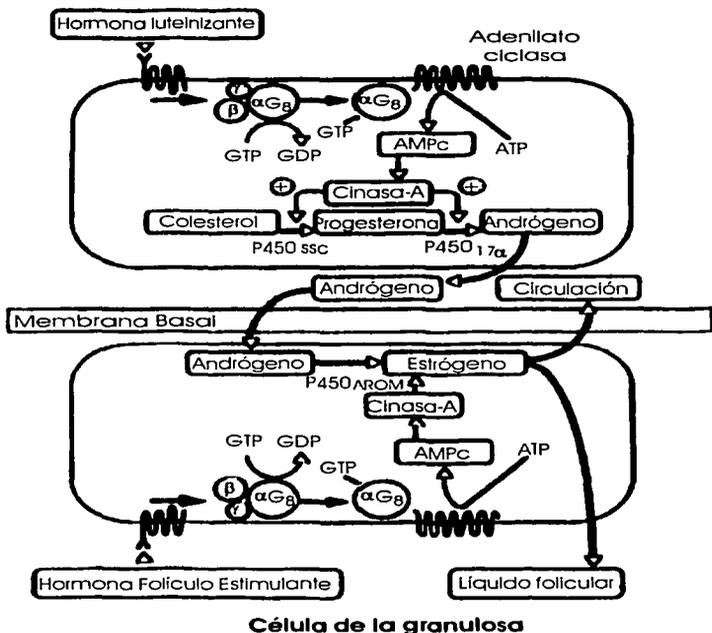


Figura 3. Esquema que representa la teoría de la doble célula la doble hormona en el ovario. Guanosil trifosfato (GTP); Guanosil difosfato (GDP); Adenosin monofosfato cíclico (AMPC); Adenosin trifosfato (ATP); Subunidades de la proteína G (α , β , γ); Complejos enzimáticos (P450_{ssc}, P450_{AROM}); Estimulo inductor (+) (Tomado de: Erickson y Shimasaki, 2001).

La progesterona y los andrógenos son sintetizados por las células de la teca. La progesterona también es secretada por las células de la granulosa, y su síntesis en los folículos antrales medianos y preovulatorios es estimulada por la FSH, el efecto de la FSH es reforzado de manera sinérgica por la prolactina e inhibido por la prostaglandina F_{2α} (PGF_{2α}) (Erickson y Shimasaki, 2001).

Se ha mostrado que existen variaciones en la secreción de las hormonas esteroides sexuales y de LH durante el desarrollo prepupal de la rata. Durante esta fase, se observa el aumento en la concentración de LH en plasma, el primer aumento se presenta alrededor de los 15 días y otro a los 38 días. La concentración de progesterona es baja a lo largo de casi todo el desarrollo prepupal y se incrementa al final de la etapa peripupal (38 días de edad). Este mismo comportamiento también se observa en la secreción de 17β-estradiol. Al parecer los cambios en la esteroidogénesis que se observan durante el desarrollo prepupal están asociados a la producción de LH y FSH y al desarrollo del folículo ovárico (Castro y col., 2001).

Atresia

Del conjunto de folículos que inician su crecimiento no todos llegan a madurar completamente, la mayoría pierden su integridad funcional y son eliminados antes de que liberen su ovocito. Este proceso de degeneración se conoce como atresia folicular (Greenwald y Roy, 1994; Erickson y Shimasaki, 2001) y se presenta en todas las etapas del desarrollo folicular (Hsueh y col., 1994).

Los eventos histológicos que caracterizan a un folículo atrésico son muy variables y a menudo es difícil identificarlos. Diversos rasgos morfológicos y bioquímicos caracterizan a la atresia folicular, tales como: degeneración de las células de la granulosa, presencia de núcleos picnóticos en este tipo de células,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

alteración de la membrana basal y zona pelúcida, disminución de la expresión de los receptores a las gonadotropinas, incremento en la producción de progesterona y disminución en la síntesis de estrógenos (Hsueh y col., 1994).

Hughes y Gorospe (1991) propusieron un método cualitativo para identificar la atresia en células de la granulosa, que se probó en ovarios de ratas inmaduras (21 días). Para ello a las ratas se les administró la PMSC, la cual es inductora de la atresia folicular. Posteriormente se extrajeron los folículos y por electroforesis se analizó el ácido desoxirribonucleico en células de la granulosa, y se observó un patrón de bandas parecido a una escalera característico de las células en apoptosis. Por ello, se considera a la apoptosis como el mecanismo de degeneración celular durante el proceso de la atresia (Hsueh y col., 1994). Durante la atresia en los folículos ováricos el ovocito y las células de la granulosa y de la teca interna degeneran, mientras que la zona pelúcida es más resistente y se altera al final. Posteriormente las células en degeneración son fagocitadas por los macrófagos invasores (Geneser, 2000).

Apoptosis

La apoptosis, o "muerte celular programada" es un proceso esencial que ocurre en todas las células de los organismos multicelulares. Mientras millones de células proliferan y dan origen a nuevas unidades, otras mueren porque están programadas para morir en determinado momento o frente a determinadas circunstancias. Este mecanismo parece contribuir a modular el desarrollo de los organismos. Así mismo, parece que es el principal proceso que regula el número de células en cualquier tejido. Además, es un evento de eliminación de células que podrían representar un riesgo para el organismo, por ejemplo en células infectadas por virus y las células tumorales (Peitsch y col., 1993). El proceso de apoptosis o

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

muerte celular programada en el ovario se presenta en las células germinales, foliculares y luteales (Wyllie, 1980; Tilly, 1996; Hsu y Hsueh, 1998).

Se han realizado estudios de apoptosis durante el desarrollo del nemátodo *Caenorhabditis elegans* en los que se han identificado tres genes que al parecer regulan la apoptosis. Durante el desarrollo normal de este organismo, 131 células de las 1090 son eliminadas por muerte celular programada, donde participan dos genes, *ced-3* y *ced-4*. Si cualquiera de estos dos genes es inactivado la apoptosis no se lleva a cabo. Un tercer gen, *ced-9*, funciona como un regulador negativo de la apoptosis. Si *ced-9* es inactivado por una mutación, las células que normalmente sobrevivirían no lo hacen y provocan la muerte del animal. Por el contrario, si el gen *ced-9* se sobreexpresa, la apoptosis no se lleva a cabo en las células en las que debería ocurrir (Hsu y Hsueh, 1998; Cooper, 2000).

En las células que sufren apoptosis el ADN del núcleo se fragmenta en secciones de 180 a 200 pares de bases. Estos fragmentos de ADN al observarse en geles de agarosa, se aprecian como bandas que asemejan una escalera, imagen que es diferente al patrón difuso de la ruptura al azar en la necrosis celular. Posteriormente se da la contracción de los organelos celulares y como consecuencia incrementa la densidad de la célula. Durante este proceso la célula se encoge y se condensa y el citoesqueleto se colapsa. La superficie celular se altera y provoca que la célula moribunda sea fagocitada inmediatamente por sus vecinas o por los macrófagos (Tilly, 1996; Kaipia y Hsueh, 1997; Alberts y col., 1999). Este proceso de apoptosis no produce una respuesta inflamatoria, como es en el caso de la necrosis (Wyllie, 1980). Las células que mueren por necrosis inducen el proceso de inflamación en el tejido que las rodea y vierten su contenido sobre sus vecinas, mientras que, una célula que muere por apoptosis no daña a sus células vecinas (Cooper, 2000).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En el ovario la apoptosis es un proceso regulado por diferentes hormonas, entre las que se encuentran las hormonas esteroides ováricas (progesterona, testosterona y estradiol), gonadotropinas (FSH y LH) y los factores de crecimiento (epidermal y de crecimiento de los fibroblastos). Algunas de estas hormonas y factores son inductoras del proceso de apoptosis, como es la testosterona, mientras que otras como el estradiol, ayudan a mantener la salud de las células foliculares (Billig y col. 1993).

El proceso de apoptosis converge en la mitocondria, en la cual, interactúan miembros de la familia Bcl-2 pro- y anti-apoptóticos en su superficie. Un exceso de la actividad pro-apoptótica provoca la liberación del citocromo c, que al unirse al factor activador de proteasa 1 (APAF-1) y a la pro-caspasa 9 forma el complejo apoptosoma. Este complejo activa la cascada de caspasas, tales como la caspasa 3, que estimulan diversos eventos, como la liberación de la caspasa activadora de la enzima DNAasa (CAD), que provoca la fragmentación del ADN. La caspasa 3 participa en la exposición de la fosfatidil-serina al exterior de la membrana, la cual favorece el reconocimiento de los cuerpos apoptóticos por los macrófagos (Figura 4) (Markström y col., 2002; Maillet y col., 2002).

Estudios *in vivo* e *in vitro*, muestran que las gonadotropinas, principalmente la FSH, actúan como factores de supervivencia en las células de la granulosa. Cuando a ratas adultas se les hipofisectomiza aumenta la atresia folicular, probablemente debido a la falta de gonadotropinas. Esta evidencia permite pensar que el folículo requiere de las gonadotropinas para poder sobrevivir hasta convertirse en un folículo preovulatorio (Ámsterdam y col., 1998).

Cuando se analiza el proceso de apoptosis en los folículos se observa que éste aparece primero en aquellas más distantes a la membrana basal, lo que probablemente se deba a que la membrana basal contiene factor de crecimiento fibroblástico básico el cual favorece la sobrevivencia de las células y la esteroidogénesis (Ámsterdam y col., 1998).

Con base en diversos estudios se sugiere que existe relación entre la atresia de los folículos y el proceso de apoptosis. Tilly y col. (1991) mostraron que en folículos atrésicos extraídos de ovarios de pollo y de cerdo adultos, el ADN de las células de la granulosa y de la teca interna se fragmenta y sigue el patrón característico de la apoptosis. De la misma forma se analizó el ADN de folículos preovulatorios y pos-ovulatorios y se encontró que la cantidad de ADN fragmentado era mayor en los folículos pos-ovulatorios que en los preovulatorios. Estos resultados llevaron a los autores a confirmar que existe una relación entre la atresia folicular y el proceso de apoptosis. Así mismo, que en los folículos preovulatorios es menos probable que se lleve a cabo el proceso de apoptosis que en los pos-ovulatorios y en desarrollo.

Tilly y col. (1992) mostraron que en los folículos atrésicos del ovario de la cerda cíclica disminuye el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica para los receptores de membrana de las gonadotropinas y del citocromo P450, y la concentración de estrógenos en el fluido folicular. De lo anterior los autores concluyen que las concentraciones de las gonadotropinas y de estrógenos disminuyen y que debido a esto se activa una endonucleasa apoptótica que induce la atresia del folículo, lo que indica que los estrógenos tienen una gran influencia en el desarrollo de las células foliculares y del mismo folículo ovárico.

En estudios *in vitro* e *in vivo* se ha mostrado que el desarrollo y la diferenciación del folículo ovárico así como el proceso de apoptosis, son regulados

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

por un conjunto de hormonas y factores de crecimiento. En los folículos ováricos antrales tempranos, extraídos de ratas prepúberes y mantenidos *in vitro*, la FSH inhibe el proceso de apoptosis en un 60%, similar a la producida por la administración de adenosin 3'5'-monofosfato cíclico dibutilil, análogo del segundo mensajero para la FSH (Chun y col., 1996).

En estudios *in vitro* se ha observado que en las primeras horas después de la inducción de la apoptosis en células de la granulosa de folículos preovulatorios, se incrementa la producción de progesterona en el medio. Este hecho posiblemente esté asociado a que la estructura de la mitocondria no se altera y pasa a formar parte de los cuerpos apoptóticos junto con gotas de lípidos, por lo cual el proceso de esteroidogénesis se hace más eficiente (Amsterdam y col., 1998).

Entre los factores que participan en la sobrevivencia de los folículos se encuentra el factor de crecimiento parecido a la insulina I (IGF-I), el cual inhibe la fragmentación del ADN, la interleucina-1 β (IL-1 β), que incrementa la producción de progesterona en los folículos antrales tempranos e impide la fragmentación del ADN, estimula la producción de óxido nítrico en cultivos de folículos preovulatorios y estimula la generación de GMPC. Los factores de crecimiento EGF, TGF- α y el de crecimiento básico de fibroblastos también participan en la sobrevivencia del folículo (Tilly y col., 1992).

Además de los factores antes mencionados, las hormonas secretadas por el propio ovario, como la activina, intervienen en el mantenimiento de la integridad de las células de la granulosa debido a que estimula la producción de gonadotropinas y la expresión de los receptores a la FSH en la gónada (Chun y col., 1996).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La LH y la GH también están involucradas en este proceso, aunque en menor proporción. La GH activa el complejo de tirosin cinasas e incrementa la concentración de IGF-I. Se sugiere que existen mecanismos de control endocrinos, paracrinos y autocrinos involucrados en la regulación de la apoptosis en el folículo (Chun y col., 1996). La sobrevivencia del folículo depende de la disminución o el aumento de los factores hormonales asociados con el desarrollo del folículo y de la expresión de sus receptores en las células foliculares.

La participación de los factores de sobrevivencia depende de la etapa del desarrollo del folículo. En los folículos primordiales los factores de sobrevivencia son el EGF, el bFGF, y GDF-9 (Dong y col., 1996; Morita y Tilly, 1999). En el desarrollo de los folículos preantrales participan el KGF, el de crecimiento fibroblástico, y los estrógenos. El KGF y FGF promueven el crecimiento y la diferenciación del folículo, y en folículos preantrales de rata mantenidos en cultivo actúan como inhibidores de la apoptosis (McGee y col., 1998). La sobrevivencia de los folículos antrales tempranos depende de muchos factores, pero principalmente de la FSH. Otros factores que participan en la sobrevivencia de este tipo de folículos, aunque en menor grado son el IGF-I, la IL-1 β . También, se sugiere que la hormona de crecimiento participa en la regulación del desarrollo de los folículos antrales tempranos, aunque su efecto es mínimo (Chun y col., 1996).

En los ovarios de rata la expresión de los receptores a la LH es mayor en los folículos preovulatorios, por lo que se sugiere que esta hormona junto con la FSH disminuyen el grado de apoptosis. En estos folículos continúan actuando las hormonas y los factores de crecimiento que regulan la sobrevivencia de los folículos preantrales. Otro factor asociado al desarrollo de este tipo de folículos es la insulina debido a que disminuye el proceso de apoptosis de los folículos mantenidos *in vitro* (Chun y col., 1994). Al parecer los mediadores intracelulares que participan en la sobrevivencia de las células de la granulosa son el AMPc y el GMPc (Tilly y col.,

1992). Además de las hormonas antes mencionadas, la progesterona es un inhibidor de la apoptosis en las células de la granulosa de los folículos inmaduros y preovulatorios (Markström y col., 2002).

La condensación de la cromatina es una de las características de la apoptosis (Wyllie y col., 1980; Billig y col., 1993). Este evento es el resultado de la activación de endonucleasas dependientes de calcio/magnesio (Kypryanov y col., 1998). Se han purificado y caracterizado varias endonucleasas involucradas en el proceso de apoptosis. Entre ellas la desoxiribonucleasa I (DNAasa I), presente en los núcleos de las células de la granulosa y luteales del ovario de rata. Al parecer esta enzima es la responsable de la fragmentación del ADN (Boone y col., 1995).

Por estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado que la DNAasa I está presente tanto en células de la granulosa de folículos sanos, como en los atresicos y en cuerpos lúteos (Boone y Tsang, 1997). Estos hechos permiten sugerir que la endonucleasa está presente en las células de todos los folículos y en las luteales, pero en estado inactivo, y que se requiere de una señal para activarla y como consecuencia se lleve a cabo la fragmentación del ADN durante la atresia folicular o regresión luteal (Boone y Tsang, 1998).

Existe una familia de proteasas (caspasas), cuya activación es uno de los primeros eventos que conducen a la muerte celular programada (figura 5) (Yuan, 1997). Las caspasas son efectores y ejecutores de la muerte celular programada, que provocan la apoptosis, al actuar sobre más de 40 proteínas de la célula. Entre los blancos más importantes de las caspasas se encuentra un inhibidor de una DNAasa, que cuando se activa produce la fragmentación del ADN nuclear. Además, las caspasas se pegan a la membrana nuclear, y ocasionan la fragmentación del núcleo y de las proteínas del citoesqueleto, provocando la ruptura del citoesqueleto,

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

formación de cuerpos apoptóticos y fragmentación de la célula (figura 5) (Cooper, 2000).

Las caspasas son sintetizadas como precursores inactivos que son convertidos a la forma activa por una división proteolítica, catalizada por otras caspasas. La activación de las caspasas inicia una serie de reacciones en cadena que culminan con la muerte de la célula. Ced-4 y Apaf-1 (su homólogo en los mamíferos) se une a otras caspasas y promueven su activación debido a la formación de un complejo en el cual dos caspasas pueden adherirse y activar a otra. En cambio, Ced-9 inhibe la activación de la caspasa. En los mamíferos se expresa una familia de proteínas relacionadas con la Ced-9 (llamada Bcl-2). Algunos miembros de la familia Bcl-2 y que incluyen a la misma Bcl-2, funcionan como inhibidores de la activación de las caspasas y de la apoptosis (Kaipia y Hsueh, 1997).

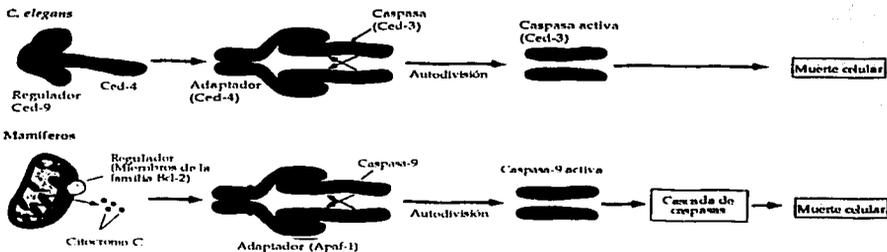


Figura 5. Diferencias y similitudes en el proceso de apoptosis entre un nematodo (*C. elegans*) y los mamíferos (Tomado de: Cooper, 2000).

En las células de mamífero, los miembros de la familia Bcl-2 actúan principalmente en la mitocondria. La caspasa-9 es activada por la formación de un

complejo con la Apaf-1, de forma similar a la Ced-3 en *C. elegans*. Sin embargo la formación de un complejo con Apaf-1 no es suficiente para la activación de la caspasa-9, ya que requiere de la formación de un complejo que consiste de Caspasa-9, Apaf-1 y citocromo *c* (figura 5) (Kaipia y Hsueh, 1997; Hsu y Hsueh, 1998; Cooper, 2000).

En la rata, Boone y Tsang (1998) mostraron la influencia de la Caspasa-3 en el proceso de atresia folicular y la regresión luteal en la rata, así como los cambios en la distribución de esta Caspasa durante estos procesos. La Caspasa-3 induce la activación de la endonucleasa endógena que propicia la atresia del folículo. La Caspasa-3 está presente en las células apoptóticas de la granulosa, y no se observaba en las células sanas, mientras que esta enzima se ha identificado en células luteales sanas.

Serotonina y Funciones del Ovario

Además de las hormonas producidas por la adenohipófisis y de las propias hormonas ováricas y factores de crecimiento, las catecolaminas (adrenalina y noradrenalina) y la serotonina también participan en la regulación de las funciones del ovario. Al parecer las catecolaminas ejercen un efecto facilitador en la regulación de la función del ovario, amplificando el efecto estimulante de las gonadotropinas en la secreción de esteroides por las células de la teca y la granulosa (Dominguez y col., 1991). Los resultados que señalan la participación de la serotonina en la regulación de la ovulación y la esteroidogénesis son contradictorios (Kordón y col., 1968; Labhsetwar, 1971; Ayala y col., 1993).

En el sistema nervioso central la serotonina es producida en los núcleos del ráfe (dorsal, medial y del puente), que se localizan en el cerebro medio. Las neuronas de estos núcleos envían sus fibras al cerebro anterior y se distribuyen en

las diferentes regiones del encéfalo, como el hipotálamo donde la amina actúa como un neurotransmisor (Takeuchi, 1988). Sin embargo la serotonina también se encuentra en el ovario y otros órganos periféricos (Battista y Condon, 1986).

La serotonina que se localiza en el ovario, se origina de los mastocitos y de las plaquetas. Esta amina al parecer participa en la regulación de la esteroidogénesis por la gónada y como consecuencia, posiblemente esté implicada en la regulación de la maduración folicular. En el criceto se ha mostrado que los mastocitos se localizan principalmente en el hilio y en la entrada y salida de los vasos sanguíneos que irrigan al ovario. Durante el proestro se produce la degranulación de los mastocitos y se sugiere que este evento se asocia al incremento en la concentración de progesterona y testosterona en suero (Battista y Condon, 1986; Krishna y Terranova, 1985).

Los resultados de diversos estudios llevan a pensar que la serotonina está involucrada en la regulación de las funciones del ovario, la ovulación y esteroidogénesis. En la rata adulta la concentración de serotonina en ovario varía en las diferentes etapas del ciclo estral. En el día del estro la concentración de serotonina es mayor en relación al de los otros días, por lo que se sugiere que la serotonina modula el proceso de ovulación (Claussell y Soliman, 1978). En la rata prepúber de 24 días de edad el tratamiento con serotonina bloquea la ovulación inducida por la administración de PMSG, aunque no modifica el desarrollo folicular. En los ovarios de estos animales se observan folículos luteinizados (O'Steen, 1964). Cuando los animales además de recibir serotonina son sometidos al tratamiento secuencial con PMSG más hCG disminuye la cantidad de ovocitos liberados, se retrasa la edad de apertura vaginal. El bloqueo de la ovulación se acompañó de la disminución del peso de los ovarios. Estas observaciones llevaron al autor a pensar que la serotonina regula de manera inhibitoria la ovulación, aunque el sitio y mecanismo de acción aún no se conocen con exactitud (O'Steen, 1965).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En estudios *in vitro* realizados con ovarios de criceto se observó que la serotonina estimula la contracción de las células musculares lisas que rodean al folículo. Este proceso provoca cambios en la forma del folículo y un incremento en la presión intrafolicular. Este hecho llevo a los autores a pensar que la serotonina puede modular el proceso de ovulación, aunque esto no se ha demostrado *in vivo* (Talbot y Schroeder, 1982).

Schmidt y col. (1988) mostraron que cuando los ovarios de ratas son mantenidos *in vitro* y se adiciona serotonina o LH al medio, se induce la ovulación, aunque en mayor proporción con la gonadotropina. Sin embargo, cuando se adiciona al medio antagonistas de los receptores a serotonina del tipo 5-HT₂ (ketanserina) o de los tipos 5-HT₁ y 5-HT₂ (metilsergide), en combinación con serotonina o LH, la ovulación disminuye. Con base en estas observaciones, los autores sugieren que la serotonina modula el proceso de ovulación, posiblemente al actuar localmente por medio del proceso de inflamación que precede a la ruptura del folículo.

Cuando a ratas prepúberes se les administra p-clorofenilalanina (inhibidor de la síntesis de serotonina) o nialamida (inhibidor de la aminooxidasa), disminuye el peso de los ovarios, del útero y se bloquea la ovulación. En cambio, cuando se inyecta la serotonina directamente en el hipotálamo, se bloquea la liberación de LH. Estas evidencias apoyan la idea de que la serotonina regula la ovulación posiblemente al modificar la secreción de las gonadotropinas y en particular de la LH (Kordon, 1969).

Resultados previos del laboratorio han mostrado que cuando ratas de 30 días de edad son tratadas en forma crónica con sulfato de serotonina, se bloquea la ovulación en el 60% de los animales. Esto se acompaña del incremento en la

población de folículos preovulatorios y del índice de atresia folicular. Estos hechos, nos llevaron a pensar que la serotonina modula de manera inhibitoria la respuesta del ovario a la FSH y LH y como consecuencia el crecimiento y maduración del folículo ovárico que culmina con la primera ovulación (Morán y col., 2001).

Además de la participación de la serotonina en la ovulación se sugiere que también interviene en la regulación de la estroïdogénesis (O'Steen, 1965). Battista y Condon (1986) observaron que en el cuerpo lúteo de vaca mantenido *in vitro*, la administración de serotonina estimula la producción de progesterona.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

JUSTIFICACIÓN

Con base en los antecedentes antes mencionados podemos plantear que el sistema serotoninérgico participa en la modulación de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas. Otra posibilidad es que la amina actúe en el propio ovario y module el flujo sanguíneo de la gónada y el proceso de esteroidogénesis. También se ha observado que la estimulación del sistema serotoninérgico realizada durante la etapa juvenil de la rata, bloquea parcialmente la ovulación en el día del primer estro vaginal e incrementa el proceso de atresia folicular. Es posible que los cambios antes mencionados sean el resultado de:

- Modificación en la secreción de las gonadotropinas
- Modificación en la respuesta del ovario a la FSH y LH
- Cambios en la producción de la testosterona, hormona inductora de apoptosis en las células de la granulosa y como consecuencia en la atresia folicular.

Por ello, en el presente proyecto se analizó el proceso de apoptosis durante el desarrollo prepuberal y la participación de la serotonina en la diferenciación y desarrollo del folículo ovárico, utilizando a la rata como modelo de estudio.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

HIPÓTESIS

En el animal prepúber la serotonina inhibe la respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas, que son esenciales para el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos y la ovulación. Por ello, es posible que la estimulación del sistema serotoninérgico durante la fase juvenil se traducirá en el incremento del proceso de apoptosis y como consecuencia en la incidencia de atresia en el folículo ovárico.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la estimulación del sistema serotoninérgico en el proceso de apoptosis y atresia folicular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analizar el proceso de apoptosis en las células de la granulosa de los folículos ováricos durante el desarrollo prepupal de la rata hembra.
- Evaluar el proceso de apoptosis en las células de la granulosa de los folículos ováricos de animales con estimulación del sistema serotoninérgico.
- Analizar los efectos de la estimulación del sistema serotoninérgico en la concentración de progesterona, testosterona y 17β -estradiol en el suero.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CIIZ-V mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h). En el día 21 de edad se retiró la madre (destete) y las crías tuvieron libre acceso al agua y al alimento.

1.- Identificación del proceso de apoptosis durante la etapa peripuberal.

Se utilizaron ratas hembras sin tratamiento de 32, 35 ó 37 días de edad.

2.- Administración de 5-hidroxitriptamina (5-HT) durante la etapa peripuberal.

Animales de 30 días de edad se trataron diariamente con 37.5 mg/Kg de peso corporal de sulfato de serotonina por vía subcutánea. Como grupo de comparación se utilizaron animales tratados con solución salina (0.9 %). Grupos de animales de ambos tratamientos fueron sacrificados a los 32, 35 ó 37 días.

Procedimiento de autopsia

Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados por decapitación. Se extrajeron los ovarios y el útero, que se pesaron en balanza de precisión. Los ovarios se colocaron en paraformaldehído al 4 %, posteriormente se colocaron en alcohol al 70 % y se incluyeron en parafina. Se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3500 r.p.m. durante 15 minutos y se colectó el suero, el que se almacenó a -20°C para la posterior cuantificación de progesterona, testosterona y 17β -estradiol por radioinmunoanálisis.

Cortes histológicos

Los ovarios derechos fueron cortados en forma seriada (cortes de 7 μm) y se colectaron tres cortes después de una serie de diez hasta cortar todo el ovario.

Tinción para la identificación de apoptosis

Para la identificación de apoptosis en las células de la granulosa de los folículos en los diferentes estadios del desarrollo, los cortes histológicos se procesaron siguiendo la técnica de TUNEL propuesta por Billig y col. (1993). Se utilizó un kit comercial (Boehringer Mannheim Corp., Indianapolis, IN, USA). Las células de la granulosa sanas se diferencian de las apoptóticas debido a que estas últimas se marcan y presentan una coloración café. Para validar esta técnica se efectuaron dos controles, uno positivo y uno negativo. El control positivo fue tratado con DNAasa I, que induce la fragmentación del ADN de todas las células, por lo cual resultan positivas a la técnica de TUNEL, mientras que en el testigo negativo no se presenta la coloración café, debido a que en éste no se colocó la enzima que permite que la marca se una al ADN fragmentado y por lo tanto todas las células resultan negativas a TUNEL. Con un ocular micrométrico a los folículos en los que se realizó la evaluación del número de células apoptóticas se les midieron dos diámetros (el mayor y el perpendicular al primero). El diámetro promedio se calculó con la relación:

$$\text{Diámetro promedio} = [\text{Diámetro mayor} + \text{Diámetro perpendicular}]/2$$

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

- Pequeños (<200 μm)
- Medianos (<200-400 μm)
- Preovulatorios (>400 μm)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Los folículos fueron clasificados con base al número de células que presentaban marca (modificado de Kim y col., 1999) en las siguientes categorías:

- a) Marca moderada: aquellos que presentaban entre 2-10 células con marca en las primeras capas de células de la granulosa alrededor del antro folicular.
- b) Marca intensa: los que presentaron entre 11-20 células de la granulosa con marca y presencia o no de cuerpos apoptóticos (pequeñas vesículas que se forman a partir de la membrana nuclear y celular, que contienen los componentes celulares).
- c) Marca muy intensa: los folículos que presentaron más de 20 células de la granulosa con marca y presencia de cuerpos apoptóticos en el antro folicular.

Cuantificación de Hormonas

La cuantificación de progesterona, testosterona y 17β -estradiol se realizó en el suero por la técnica de radioinmunoanálisis, mediante un kit (Coat-A-Count), que consta de tubos impregnados con un anticuerpo, viales con la hormona marcada que se va a cuantificar y soluciones para realizar la curva patrón. La concentración de progesterona se expresó en ng/ml de suero, la de testosterona en pg/ml de suero y la de 17β - estradiol en ng/ml de suero.

Cuantificación de serotonina y su metabolito

En el día de la autopsia se disecó el hipotálamo anterior, medio y posterior siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982). La cuantificación de serotonina y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), se realizó siguiendo la metodología previamente descrita por Ayala y col. (1998). En breve, las muestras se pesaron y homogenizaron en 300 μ l de ácido perclórico 0.1M. Se centrifugaron a 12500 r.p.m. durante 30 min a -4°C . El sobrenadante se filtró utilizando una membrana millipore con un diámetro de poro de 0.22 μm . Veinte μ l

TESIS CON
FALLA DE URGEN

del filtrado se inyectaron al sistema de cromatografía de líquidos de alta presión (Apéndice A). Los resultados de la concentración de serotonina y su metabolito se expresaron en ng/mg de tejido. La actividad de la neurona serotoninérgica se calculó de acuerdo a la relación propuesta por Shannon y col. (1986).

$$\text{Actividad neuronal} = [5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$$

Análisis estadístico

Los resultados del peso corporal y de los órganos, concentración de serotonina, de su metabolito y actividad de la neurona serotoninérgica en las tres regiones del hipotálamo, así como de las hormonas esteroides en suero se analizaron por la prueba de "t" de Student o ANOVA seguido por la prueba de Tukey (cuando se compararon más de dos grupos). Los resultados de diámetros foliculares y apoptosis se analizaron por la prueba de Ji cuadrada. En todos los casos únicamente se consideraron significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad (p) fue igual o menor al 0.05.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

RESULTADOS

Caracterización del proceso de apoptosis durante la etapa peripuberal.

Peso corporal y de Órganos

Los resultados del peso corporal de los animales testigo absoluto sacrificados a las diferentes edades se muestran en el cuadro 1, en el que se observa un incremento en el peso de los animales conforme avanza la edad.

Cuadro 1. Media \pm e.e.m. del peso corporal, masa ovárica y peso del útero de ratas testigo absoluto sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.

Edad (días)	n	Peso corporal (g)	Masa ovárica (mg)	Peso del Utero (mg)
32	10	92.2 \pm 2.9	28.1 \pm 2.0	79.2 \pm 10.2
35	9	86.3 \pm 7.7	27.3 \pm 4.1	99.4 \pm 22.8
37	7	118.3 \pm 2.6	33.9 \pm 8.0	71.6 \pm 34.9

El peso de los ovarios no se modificó entre los 32 y 37 días. En cambio, el peso del útero se incrementó a los 35 días en relación a la edad anterior, aunque esta diferencia no fue significativa (Figura 1).

Población folicular y apoptosis durante el desarrollo peripuberal

El número total de folículos medidos en los ovarios de ratas sacrificadas a los 32, 35 ó 37 días fue constante, aunque se observó una disminución a los 37 días que no fue significativa. En todas las edades estudiadas, del total de folículos medidos, la proporción de folículos que presentaron marca en las células de la granulosa (apoptosis) fue menor que los que no presentaron marca (cuadro 2).

Cuadro 2. Media \pm e.e.m. de folículos totales y porcentaje de folículos con marca y sin marca de ratas testigo absoluto sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.

Edad (días)	Folículos totales	Folículos con marca (%)	Folículos sin marca (%)
32	139.3 \pm 24.5	30.6	69.4
35	148.7 \pm 37.0	29.6	70.4
37	121.0 \pm 33.5	35.5	64.5

En la figura 6 se presenta una fotografía de folículos que se emplearon como testigo negativo y positivo para validar la técnica. En el testigo negativo se observan las células teñidas del color característico de la técnica de hematoxilina y aparentemente sanas. Por otra parte, el testigo positivo muestra la coloración café característica de la técnica de TUNEL, la cual indica la fragmentación del ADN de todas las células.

Cuando se analizaron los folículos en función de su tamaño, se observó que el porcentaje de folículos pequeños, medianos y preovulatorios, fue constante en todas las edades estudiadas (Figura 7). La proporción de folículos pequeños que presentaron apoptosis en las células de la granulosa fue menor que en los folículos medianos y preovulatorios. A la edad de 32 días, los folículos preovulatorios presentaron una mayor incidencia de apoptosis en células de la granulosa, mientras que a los 35 ó 37 días esta proporción fue mayor en los medianos (Figura 8).

En los folículos pequeños sanos se observa que las células de la granulosa y el ovocito no presentan ningún tipo de alteración (figura 9A y B), mientras que en los que muestran signos apoptosis se observan células positivas a TUNEL, así como también alteración en la forma de las células (figura 9C y D)). En la figura 8 se observan folículos medianos sanos y atrésicos en los cuales ya se inicio la formación del antro. En los folículos sanos las células de la granulosa presentan forma redonda y no presentan la coloración café (característica de las células en apoptosis) (figura 10A y B), mientras que en aquellos que se encontraban en proceso de atresia se

observan cuerpos apoptóticos y descamación de las células (figura 10C y D). Los folículos preovulatorios se observa que en los sanos no hay modificaciones en la forma de las células (figura 11A y B), y en los atrésicos, se observan cuerpos apoptóticos, descamación de células de la granulosa y la mayoría de las células positivas a TUNEL se encuentran alrededor del antro (figura 11C y D).

Concentración de hormonas esteroideas ováricas.

La concentración de progesterona en suero fue constante desde el día 32 hasta el 35 de edad, a los 37 días se observó un incremento que no llegó a ser significativo. La concentración sérica de testosterona se incrementó significativamente a los 35 días, y disminuyó al día 37, pero esta disminución no llegó a ser significativa. La concentración de 17β -estradiol fue mayor de forma significativa a los 35 y a los 37 días respecto a la edad anterior (Figura 12).

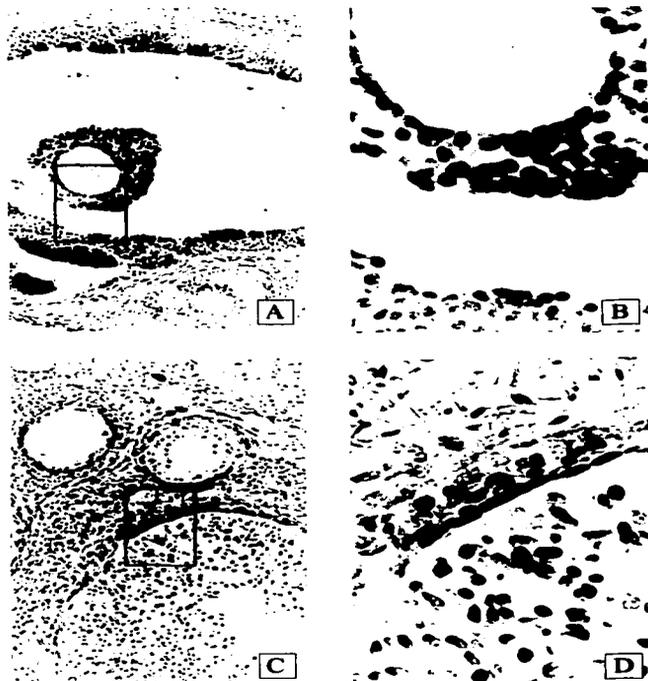


Figura 6. Fotomicrografías de cortes de ovario de rata teñidos por la técnica de TUNEL, en los que se muestra el control negativo [A (10X), B (40X)] y el control positivo [C (10X), D (40X)].

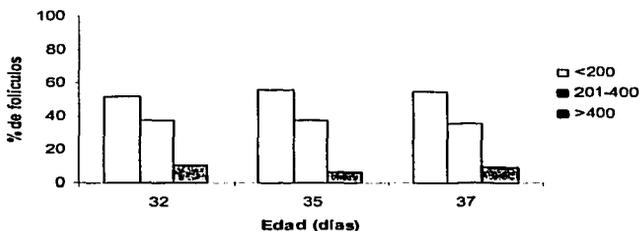
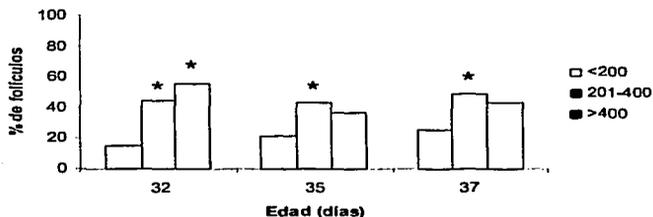


Figura 7. Porcentaje de folículos pequeños (<200 μm), medianos (201-400 μm) y preovulatorios (>400 μm) medidos en los ovarios de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.



* $p < 0.05$ vs. folículos pequeños (prueba de ji cuadrada)
 Figura 8. Porcentaje de folículos pequeños (<200 μm), medianos (201-400 μm) y preovulatorios (>400 μm) medidos en los ovarios de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal y que presentaron marca por la técnica de TUNEL.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

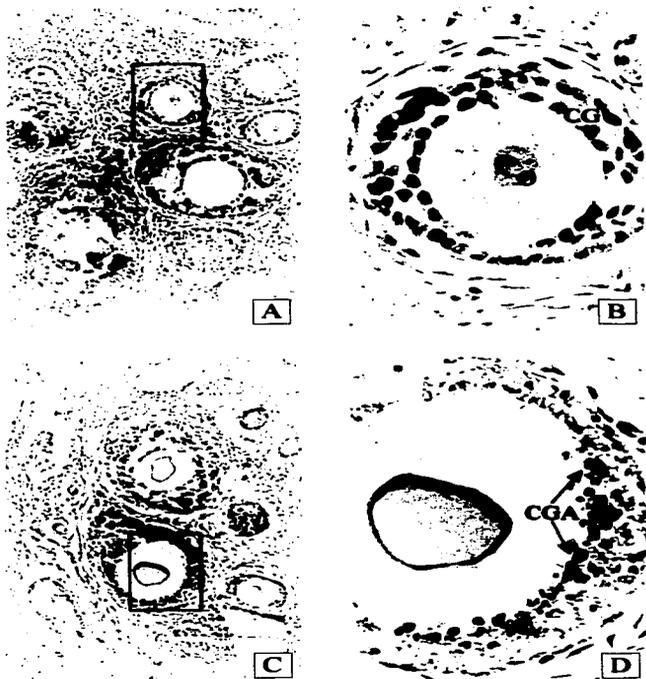


Figura 9. Fotomicrografías que muestran folículos pequeños sanos [A (10X), B (40X)] o atrésicos [C (10X), D (40X)]. Se observan las células de la granulosa sanas (CG) y en apoptosis (CGA).

TRABAJO CON
FALLA DE ORIGEN

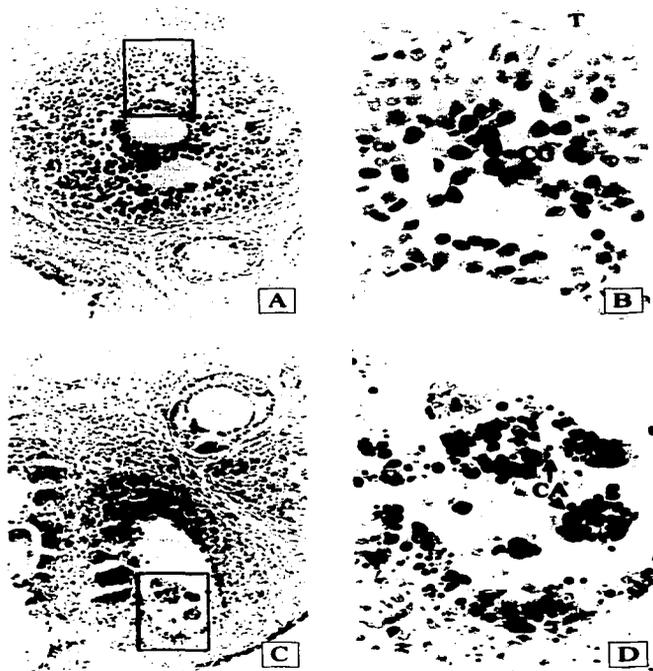


Figura 10. Fotomicrografías que muestran folículos medianos sanos [A (10X), B (40X)] o atrésicos [C (10X), D (40X)]. Se observan las células de la granulosa (CG), células de la teca (T) y cuerpos apoptóticos (CA).

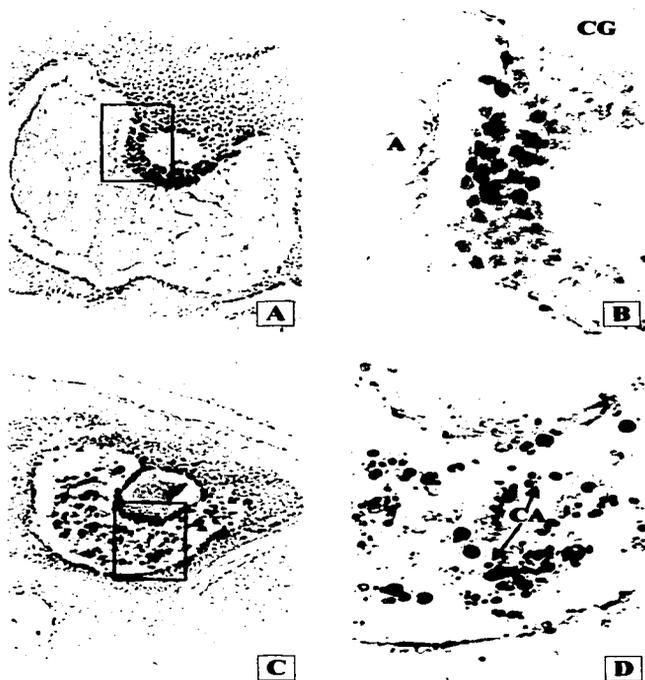
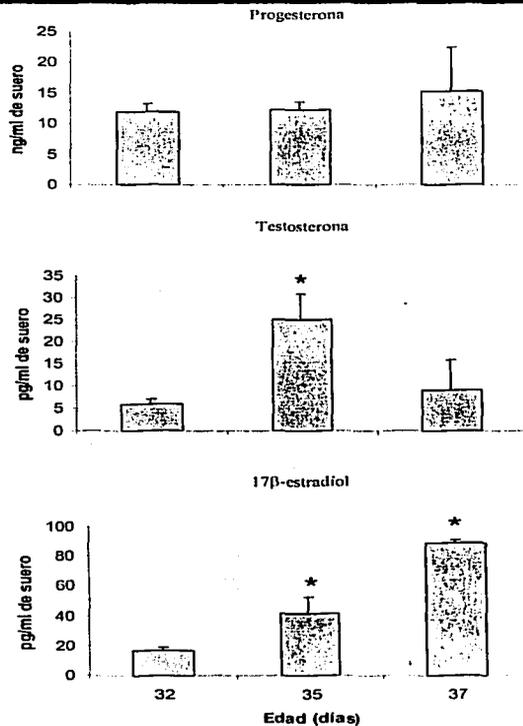


Figura 11. Fotomicrografías que muestran folículos preovulatorios sanos [A (10X), B (40X)] o atrésicos [C (10X), D (40X)]. Se observan las células de la granulosa (CG), el antro folicular (A) y cuerpos apoptóticos (CA):



* $p < 0.05$ vs. edad anterior (prueba "t" de Student)

Figura 12. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol de ratas hembras sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.

Efecto de la administración de serotonina durante la etapa peripuberal*Peso corporal y de Organos*

En los animales tratados con solución salina y sacrificados a los 37 días de edad el peso corporal fue menor en comparación con el grupo de animales testigo absoluto. En cambio en los que recibieron serotonina, el peso corporal fue menor que en los tratados con solución salina, aunque esta diferencia fue significativa exclusivamente a los 37 días de edad. El peso de los ovarios no se modificó en ninguna de las edades estudiadas. Mientras que, el peso del útero de los animales tratados con solución salina fue mayor únicamente a los 32 días respecto al testigo absoluto. En los animales tratados con 5-HT no se observaron cambios en el peso de este órgano (cuadro 3).

Cuadro 3. Media \pm e.e.m. del peso corporal, masa ovárica y peso del útero de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Sal) o con 37.5 mg/Kg de peso corporal de sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.

Grupo	Peso corporal (g)	Masa ovárica (mg)	Peso del Útero (mg)
32 días	TA	92.2 \pm 2.9	28.1 \pm 2.0
	Sal	100.3 \pm 3.0	30.7 \pm 2.5
	5-HT	92.9 \pm 1.6	29.7 \pm 1.6
35 días	TA	86.3 \pm 7.7	30.4 \pm 4.1
	Sal	95.2 \pm 2.6	30.3 \pm 3.4
	5-HT	79.4 \pm 4.4 +	27.8 \pm 1.9
37 días	TA	118.3 \pm 2.6	33.9 \pm 8.0
	Sal	99.3 \pm 3.5 *	22.1 \pm 0.6
	5-HT	97.8 \pm 5.4 *	25.5 \pm 1.0

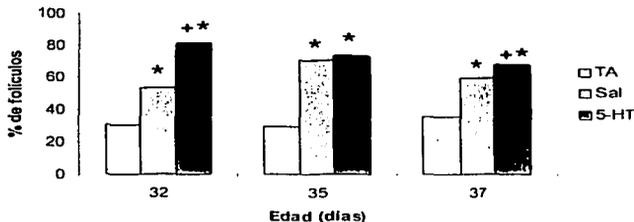
* $p < 0.05$ vs. TA (ANOVA seguida de Tukey)

+ $p < 0.05$ vs. Sal (ANOVA seguida de Tukey)

En comparación con los testigos absolutos el número total de folículos medidos en los ovarios de los animales que recibieron solución salina o serotonina no fue significativamente diferente. En los ovarios de los animales tratados con solución salina o serotonina, aumentó el número de folículos con marca. Este

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

incremento fue mayor en los animales que recibieron serotonina y se sacrificaron a los 32 ó 37 días de edad (figura 13). Debido a las diferencias observadas entre el grupo de animales testigo y los que recibieron tratamiento con solución salina, los efectos del tratamiento con serotonina se compararon con el animal que recibió solución salina.



* $p < 0.05$ vs. TA (prueba de ji cuadrada)

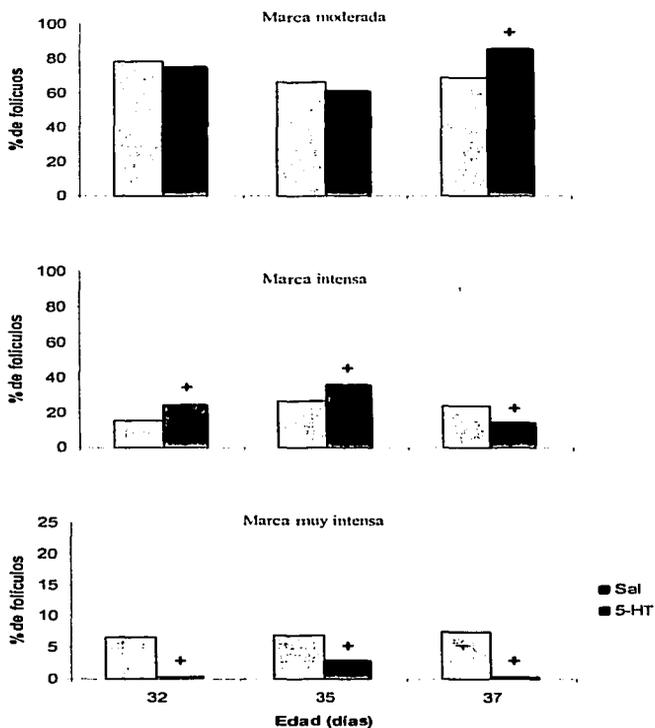
+ $p < 0.05$ vs. Sal (prueba de ji cuadrada)

Figura 13. Porcentaje de folículos totales medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (Sal) o sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal, que presentaron marca por la técnica de TUNEL.

Los resultados de la intensidad de la marca observada en los folículos de los ovarios de los animales inyectados con solución salina o serotonina se muestran en la figura 14. En los animales que recibieron serotonina y fueron sacrificados a los 37 días el porcentaje de folículos que presentaron marca moderada fue mayor [201/236(85.2%) vs. 127/186(68.3%), $p < 0.05$] que en los que recibieron solución salina. Cuando los animales se sacrificaron a los 32 ó 35 días el porcentaje de folículos con marca intensa fue mayor [32: 58/237(24.5%) vs. 32/211(15.2%); 35: 137/381(36.0%) vs. 109/406(26.8%), $p < 0.05$], mientras que a los 37 días fue menor [34/236(14.4%) vs. 45/186(24.2%), $p < 0.05$]. En cambio, la proporción de folículos con marca muy intensa fue menor en los animales que fueron tratados con

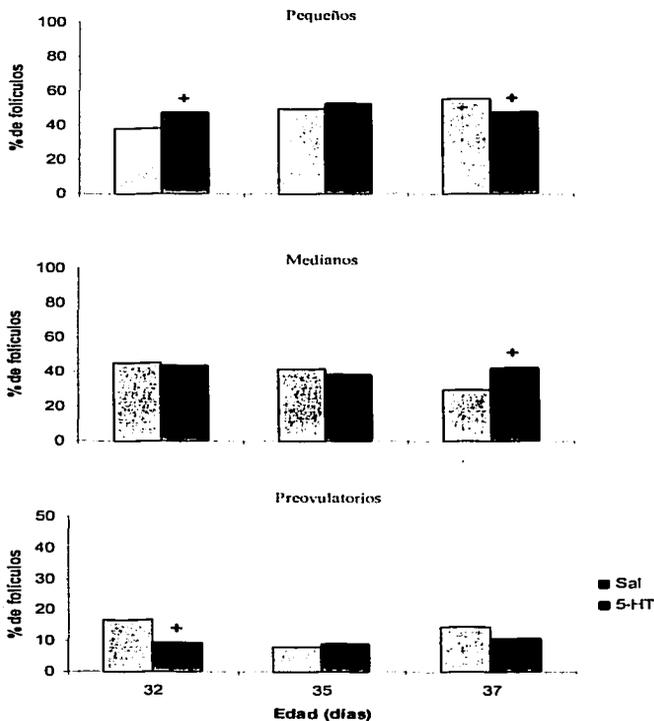
serotonina en todas las edades estudiadas [32: 1/237(0.4%) vs. 14/211(6.6%); 35: 11/381(2.9%) vs. 28/406(6.9%); 37: 1/236(0.4%) vs. 14/186(7.5%), $p < 0.05$].

En el grupo de animales que recibió serotonina el porcentaje de folículos pequeños se incrementó a los 32 días y disminuyó a los 37 días [32: 138/291(47.4%) vs. 152/398(38.2%); 37: 165/349(47.3%) vs. 174/313(55.6%), $p < 0.05$]. Mientras que, la población de folículos medianos fue mayor a los 37 días [147/349(42.1%) vs. 93/313(29.7%), $p < 0.05$] y la de folículos preovulatorios fue menor en los animales sacrificados a los 32 días de edad [27/291(9.2%) vs. 67/398(16.8%), $p < 0.05$] (figura 15).



+ $p < 0.05$ vs. Sal (prueba de ji cuadrada)

Figura 14. Porcentaje de folículos medidos en los ovarios de ratas tratadas con solución salina (Sal) o sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas diferentes edades del desarrollo peripuberal, que presentaron marca moderada, intensa o muy intensa por la técnica de TUNEL.

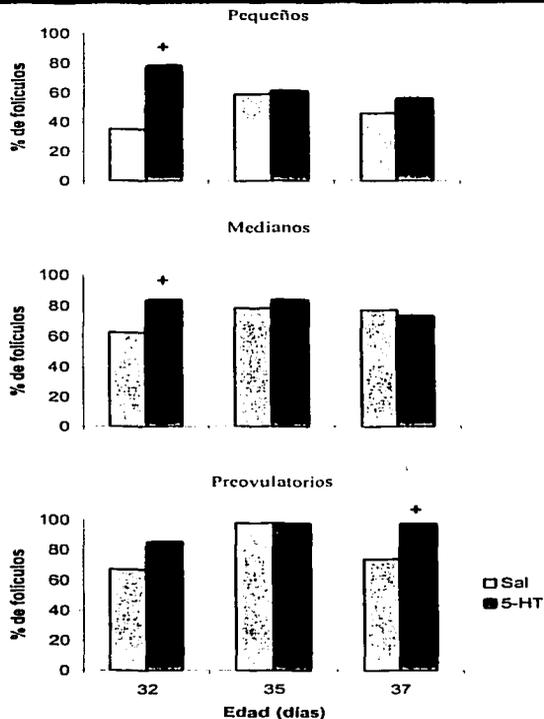


+ $p < 0.05$ vs. Sal (prueba de ji cuadrada)
 Figura 15. Porcentaje de folículos pequeños (<200 μ m), medianos (200-400) y preovulatorios (>400) medidos en los ovarios de ratas tratadas con solución salina (Sal) o con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.

En los animales tratados con serotonina el porcentaje de folículos pequeños con marca se incrementó de manera significativa en los animales sacrificados a los 32 días de edad que recibieron serotonina [109/139(78.4%) vs. 53/151(35.1%), $p<0.05$]. Este mismo comportamiento se observó en la población de folículos medianos [105/125(84.0%) vs. 112/179(62.6%), $p<0.05$]. En relación a los folículos preovulatorios se observó que en los animales que fueron inyectados con sulfato de serotonina, la proporción de folículos con marca fue mayor en los animales sacrificados a los 37 días de edad [36/37(97.3%) vs. 34/46(73.9%), $p<0.05$] (figura 16).

En los animales tratados con sulfato de serotonina la concentración de progesterona en el suero disminuyó a los 35 y 37 días de edad, aunque esta disminución fue significativa solo en los animales sacrificados a los 35 días. La concentración de testosterona en suero de los animales que recibieron serotonina y fueron sacrificados a los 32 o 37 días mostró una tendencia a incrementarse, sin que este aumento llegara a ser significativo. En cuanto a la concentración de 17β -estradiol, en los animales que recibieron sulfato de serotonina no se modificó en ninguna de las edades estudiadas (figura 17).

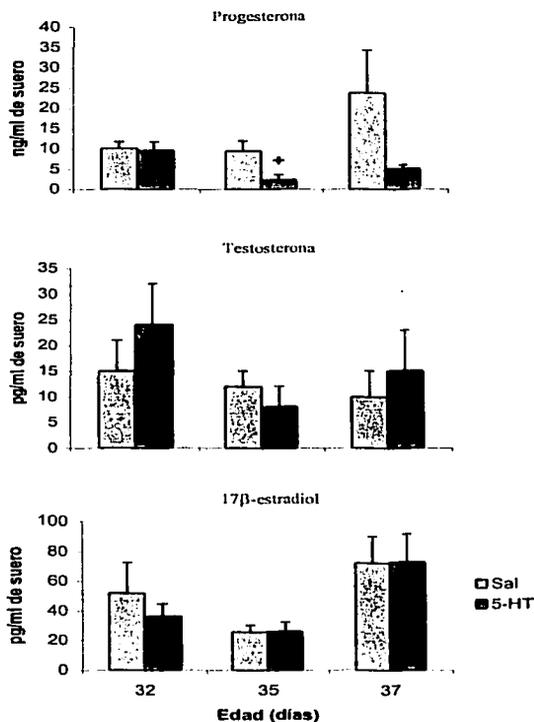
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



+ $p < 0.05$ vs. Sal (prueba de ji cuadrada)

Figura 16. Porcentaje de folículos pequeños (<200 μm), medianos (200-400 μm) y preovulatorios (>400 μm) medidos en los ovarios de ratas tratadas con solución salina (Sal) o sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal, que presentaron marca por la técnica de TUNEL.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



+ p < 0.05 vs. Sal (ANOVA seguida de Tukey)

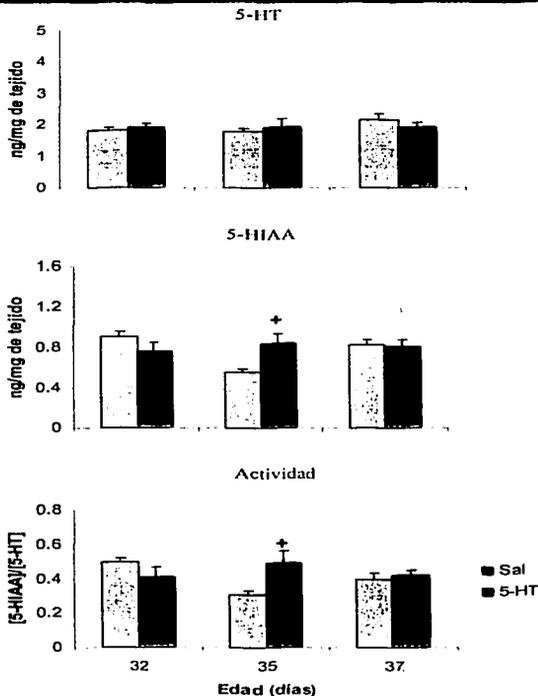
Figura 17. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol de ratas tratadas con solución salina (Sal) o sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En los animales tratados con sulfato de serotonina la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior mostró un comportamiento similar al del grupo de animales que recibieron solución salina. Sin embargo, la concentración del metabolito, el 5-HIAA, y la actividad de la neurona serotoninérgica en los animales sacrificados a los 35 días de edad fue mayor que en el grupo de animales que recibieron solución salina (figura 18).

En el hipotálamo medio de los animales que recibieron sulfato de serotonina, la concentración de serotonina y la actividad de la neurona serotoninérgica no se modificaron en ninguna de las edades estudiadas. Mientras que en los animales que fueron sacrificados a los 35 días se observó un incremento en la concentración del ácido 5-hidroxiindol acético (figura 19).

En el hipotálamo posterior de los animales tratados con sulfato de serotonina y sacrificados a los 35 días de edad la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindol acético fue mayor que en los animales que recibieron solución salina. No se observaron diferencias significativas en la actividad de la neurona serotoninérgica en esta región del hipotálamo en ninguna de las edades estudiadas (figura 20).

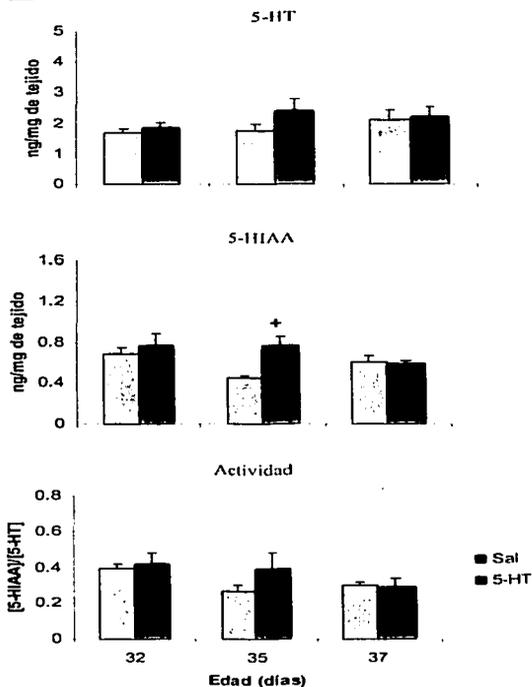


* $p < 0.05$ vs. TA (ANOVA seguida de Tukey)

+ $p < 0.05$ vs. Sal (ANOVA seguida de Tukey)

Figura 18. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la actividad de la neurona serotoninérgica ([5-HIAA]/[5-HT]) en el hipotálamo anterior de ratas tratadas con solución salina (Sal) o sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.

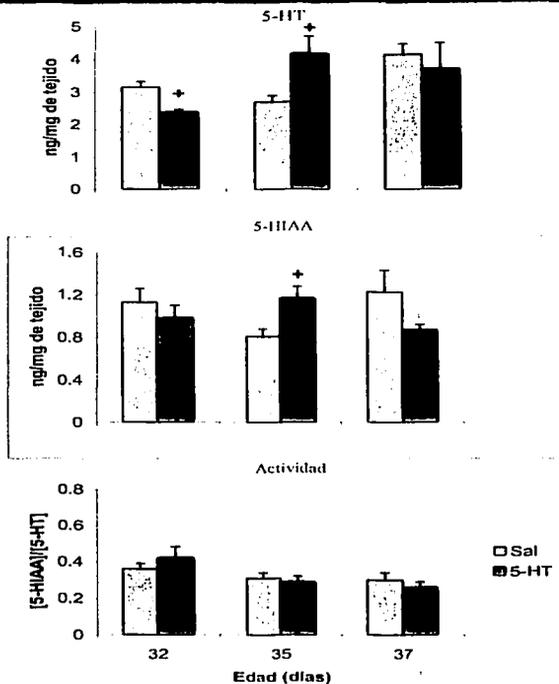
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



* $p < 0.05$ vs. TA (ANOVA seguida de Tukey)

+ $p < 0.05$ vs. Sal (ANOVA seguida de Tukey)

Figura 19. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la actividad de la neurona serotoninérgica ([5-HIAA]/[5-HT]) en el hipotálamo medio de ratas tratadas con solución salina (Sal) o sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.



* $p < 0.05$ vs. TA (ANOVA seguida de Tukey)

+ $p < 0.05$ vs. Sal (ANOVA seguida de Tukey)

Figura 20. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la actividad de la neurona serotoninérgica ([5-HIAA]/[5-HT]) en el hipotálamo posterior de ratas tratadas con solución salina (Sal) o sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes edades del desarrollo peripuberal.

Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio nos permiten sugerir que el aumento en la concentración serotonina resulta en el aumento del proceso de apoptosis y atresia folicular en el ovario. Esto posiblemente se deba a modificaciones en el proceso de esteroidogénesis, en particular en el aumento en la producción de testosterona, en respuesta al tratamiento con serotonina. Esta idea es apoyada por estudios previos en los que se muestra que la progesterona y los estrógenos actúan como factores de sobrevivencia, mientras que la testosterona estimula el proceso de apoptosis en las células de la granulosa (Billig y col, 1993; Kiess y Callaher, 1998).

El ligero aumento en el peso del ovario durante el desarrollo prepuberal del animal, es similar a lo ya observado por otros autores (Ojeda y Ramírez, 1972; Ramaley, 1979). Además del aumento del peso de la gónada es posible que este evento se acompañe de una mayor actividad esteroidogénica por parte del ovario. Esta idea se basa en el hecho de que las concentraciones de progesterona y 17β -estradiol en suero aumentan con la edad del animal como ya ha sido mostrado en otros estudios (Döhler y Wultke, 1975; Ramaley, 1979). Otro posible factor que puede contribuir al aumento en la concentración de esteroides al final de la etapa peripuberal, puede ser una mayor actividad de la glándula adrenal, ya que se ha mostrado que cuando se realiza la adrenalectomía a animales ovariectomizados se elimina la respuesta del animal castrado, que incluye el aumento en la concentración de gonadotropinas (Ramaley, 1975).

El aumento en la concentración de testosterona observado en el suero de los animales de 35 días de edad posiblemente este asociado a la disponibilidad del sustrato, para la producción de una mayor cantidad de 17β - estradiol en los días previos al inicio de la pubertad (37 días). Se ha mostrado que la testosterona

producida en las células de la teca atraviesa la membrana basal y pasa a las células de la granulosa donde es el sustrato de la enzima aromataasa, que induce su transformación a estrógenos bajo el estímulo de la FSH (Gore-Langton y Armstrong, 1994). Así mismo se ha descrito que a lo largo del desarrollo prepupal de la rata, el balance entre la producción de andrógenos y estrógenos varía. Además se ha mostrado que los ovarios de ratas prepúberes mantenidas *in vitro* producen en mayor proporción andrógenos; y en la pubertad y en la etapa adulta la producción de esta hormona es menor, mientras que la concentración de estrógenos aumenta (Koninckx y col., 1983).

Los cambios en la concentración de testosterona observados entre los 32 y 37 días de edad, parecen estar relacionados a la producción de gonadotropinas. La mayor concentración de testosterona en suero cuantificada en los animales de 35 días, podría estar asociada a la menor producción de FSH, hormona que estimula la transformación de los andrógenos a los estrógenos (Hillier, 1994). En la cepa CII-ZV se mostró que la concentración sérica de FSH es menor a los 35 días en comparación con los 30 y 38 días de edad (Castro y col., 2001). Con base en los resultados antes citados y los observados en este estudio, se apoya la idea de que los cambios en la esteroidogénesis del ovario están asociados a la acción de la FSH y LH entre otros factores.

La población de folículos de los diferentes tamaños no se ve modificada entre los 32 y 37 días de edad. Sin embargo, cuando se analiza el estado de los folículos se observa que el porcentaje de folículos que presentaron células en apoptosis es diferente a lo largo del desarrollo prepupal. Esto corrobora lo ya observado en otros estudios, en los cuales se ha mostrado que el proceso de apoptosis se lleva a cabo en el ovario de la rata desde la etapa prenatal y continúa en el nacimiento y a lo largo de toda la vida del animal (Tilly, 1996).

En este estudio se observó que la proporción de folículos sanos y aquellos que presentaron células de la granulosa en apoptosis está en relación al tamaño del folículo. La mayor proporción de folículos sanos se observó en los pequeños (<200 μm) y en los grandes (>400 μm) se incrementó la incidencia de atresia. Esto posiblemente está asociado a los cambios en la concentración de los factores de crecimiento y las hormonas asociadas al mantenimiento y desarrollo de los diferentes tipos de folículos (figura 20) (Kaipia y Hsueh, 1997; Kiess y Gallaher, 1998; Markström y col., 2002).

En los resultados de este estudio se observa que a los 32 días de edad el porcentaje de folículos preovulatorios con células en apoptosis se incrementa, mientras que no se modifica la proporción de folículos pequeños (<200 μm) y medianos (201-400 μm) con características de apoptosis. Una posible explicación a este hecho sería que en los folículos mayores de 400 μm de diámetro se incluyen los que tienen las características de un folículo preovulatorio. Sin embargo, en el día 32, o los subsiguientes este tipo de folículos posiblemente estén destinados a degenerar. Esto es debido a que no están bajo el estímulo de una alta concentración de FSH y LH ("pico" preovulatorio de gonadotropinas) que en esta cepa de ratas se presenta alrededor del día 38 (Castro y col., 2001). En cambio, en el grupo de folículos de 201-400 μm se encuentran los folículos antrales que continúan su desarrollo, y parte de ellos serán seleccionados para que maduren completamente y liberen su ovocito en el día de la primera ovulación.

Los cambios observados en el proceso de apoptosis en el folículo ovárico durante el desarrollo prepuberal de la rata, posiblemente están vinculados a la acción de las hormonas que actúan en la gónada. En relación a esto se ha descrito que el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos son regulados por las gonadotropinas, las hormonas esteroideas y los factores de crecimiento (figura 20) (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994). Así mismo, se ha mostrado que

cuando existe una deficiencia de FSH, se incrementa la incidencia de atresia en los folículos antrales (Ámsterdam y col., 1998; Markström y col., 2002).

En nuestros resultados no observamos diferencias significativas en cuanto al peso de los ovarios o del útero de los animales que fueron tratados con solución salina y aquellos que recibieron sulfato de serotonina, lo cual coincide con los resultados obtenidos por O'Steen y col. (1964), quienes administraron solución salina o serotonina durante 5 días, y no observaron diferencias en el peso de los ovarios y del útero.

La administración de sulfato de serotonina no modificó el número total de folículos, sin embargo se observó que la administración de la amina disminuyó la proporción de folículos sanos (figura 21), este hecho nos permite pensar que la serotonina altera el desarrollo de los folículos y disminuye el número de los que podrían llegar a madurar y como consecuencia disminuye el número de ovocitos que se liberen en el día del estro, como ya se mostró previamente (Morán y col., 2001).

Los resultados obtenidos en nuestro estudio muestran que la administración de serotonina incrementa la proporción de folículos con células de la granulosa en apoptosis, esto posiblemente está relacionado con la producción de hormonas esteroides durante el desarrollo prepuberal de la rata. Se sugiere que la progesterona y los estrógenos participan en la modulación del desarrollo y la diferenciación del folículo ovárico, debido a la acción mitogénica de los últimos (figura 20). Mientras que los andrógenos inducen la apoptosis vía la activación de la enzima DNAasa, responsable de la fragmentación del ADN (Huges y Gorospe, 1991; Kaipia y Hsueh, 1997). La idea de que el incremento en el número de folículos con células de la granulosa en apoptosis está asociado a modificaciones en la concentración de hormonas esteroides, es apoyada por las evidencias que señalan

que cuando ratas de 22 días son hipofisectomizadas y tratadas con estrógenos la fragmentación del ADN en células foliculares disminuye, y cuando son tratadas con testosterona el proceso se invierte (Billig y col., 1993).

La disminución en la concentración de progesterona observada en los animales que recibieron serotonina en relación con el grupo de animales tratados con solución salina, podría estar favoreciendo el proceso de apoptosis en las células de la granulosa de los folículos (figura 21), ya que existen evidencias de que la progesterona actúa como un factor de sobrevivencia de la célula (Kurita y col., 2001). Además de los cambios en la concentración de progesterona, es posible que la concentración de testosterona este asociada al incremento en la apoptosis en los ovarios de los animales que recibieron serotonina.

En los animales tratados con sulfato de serotonina y sacrificados a los 32 ó 37 días de edad la concentración de testosterona en suero mostró una tendencia a incrementarse. El cambio en la producción de esta hormona posiblemente este asociado al aumento en la incidencia de apoptosis en células de la granulosa de los folículos. Esta idea es apoyada por los trabajos previos en los que se muestra que al hipofisectomizar a ratas de 22 días de edad, y se les coloca un implante de dietilstilbestrol o testosterona se observa que hay una disminución en el peso del ovario y se incrementa 5.2 veces la fragmentación de ADN en el ovario después de 48 horas del tratamiento (Billig, 1993). Con base en nuestros resultados y los reportados por otros autores, se apoya la idea de que la testosterona es un inductor del proceso de apoptosis en las células de la granulosa.

En los animales que recibieron serotonina no se modificó la concentración sérica de 17β -estradiol y testosterona, aunque esta última mostró una tendencia a incrementarse. Sin embargo, la concentración de progesterona si se modificó. Esto posiblemente se deba a que la serotonina no afecta la acción de la LH y en

consecuencia no se modifica el proceso de aromatización de andrógenos a estrógenos, por lo que la concentración de esta hormona no se ve modificada. Se ha observado que la activación de los receptores a LH en las células de la teca lleva a la estimulación en la producción de altas concentraciones de androstenediona, la cual es aromatizada a estradiol en las células de la granulosa (Hillier, 1994; Erickson y Shimasaki, 2001).

La disminución de la proporción folículos sanos en los animales que recibieron el tratamiento con sulfato de serotonina posiblemente se debe a que la serotonina modifica la secreción de las gonadotropinas y en particular de la FSH, la cual tiene un efecto mitogénico sobre las células de la granulosa y favorece el crecimiento y diferenciación del folículo (Erickson y Shimasaki, 2001). Esta idea es apoyada por los resultados obtenidos por Moran y col. (2001), quienes mostraron que en animales de 30 días de edad que son tratados de forma crónica con serotonina, la concentración de FSH en suero disminuye y se bloquea parcialmente la ovulación.

En los animales que fueron tratados con sulfato de serotonina no se observaron cambios en las concentraciones de serotonina, su metabolito (ácido 5-hidroxiindolacético) ni en la actividad de la neurona serotoninérgica en hipotálamo anterior y medio, lo cual nos permite pensar que la serotonina administrada por vía subcutánea no modificó la secreción de GnRH en el hipotálamo, debido a que la serotonina por ser una sustancia hidrofóbica no es capaz de atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica (Bouchaud, 1972). Sin embargo, la eminencia media se encuentra fuera de esta barrera, por lo que la serotonina administrada por vía subcutánea no modificó la síntesis de las gonadotropinas pero posiblemente sí disminuyó la liberación de la GnRH al sistema porta-hipotálamo-hipofisario y como consecuencia la secreción de la FSH. Esta idea se ve apoyada por el hecho de que se ha mostrado por medio de estudios de inmunohistoquímica, que en la

eminencia media existe una comunicación entre las terminales nerviosas de las neuronas GnRHérgicas y las que sintetizan la serotonina (Jennes y col., 1985).

Otro posible sitio de acción de la serotonina posiblemente es la propia gónada, al modificar la respuesta del ovario a la acción de las gonadotropinas y como consecuencia en la esteroidogénesis y en el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. Esta idea es apoyada por los resultados obtenidos por O'Steen (1965) quien observó que al administrar PMSG, a ratas de 24 días tratadas con serotonina, disminuye el número de ovocitos, mientras que en aquellas a las que únicamente se les administraba serotonina se bloquea la ovulación.

La idea de que la serotonina puede actuar en el propio ovario, es apoyada por las evidencias que muestran la presencia de receptores a serotonina en el ovario del tipo 5-HT₁ y 5-HT₂. Además cuando en ovarios de ratas prepúberes previamente estimuladas con PMSG mantenidas *in vitro*, se les adiciona ketanserina (bloqueador de los receptores del tipo 5-HT₂) disminuye la ovulación (Schmidth, 1988).

El incremento en la incidencia de apoptosis observado en los animales que recibieron serotonina posiblemente también este asociado a los efectos de la amina en la esteroidogénesis. En relación a esto se plantea que la serotonina regula la esteroidogénesis en el ovario vía sus diferentes receptores (Tanaka y col., 1993).

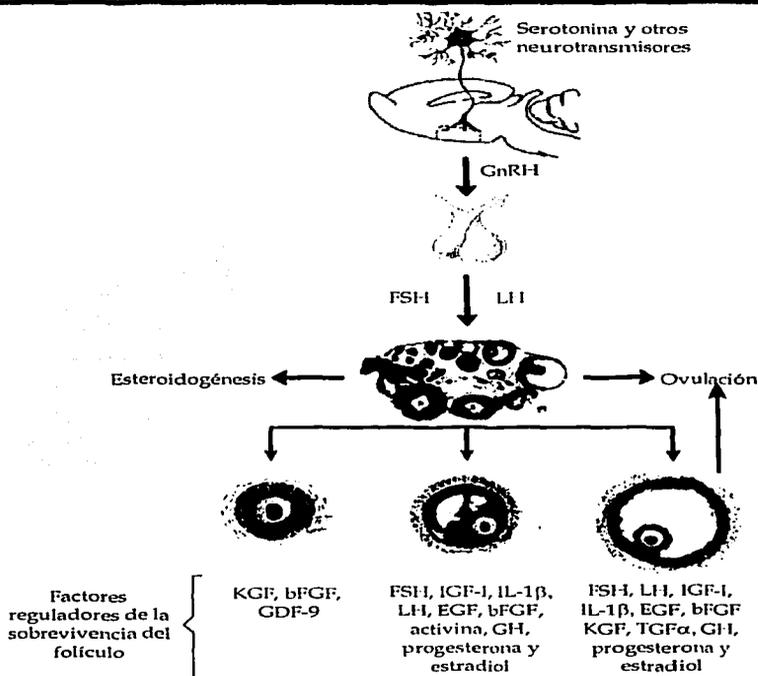


Figura 20. Hormonas que regulan las funciones del ovario y factores asociados a la modulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas); FSH (hormona estimulante del folículo); LH (hormona luteinizante); KGF (factor de crecimiento keranocítico); bFGF (factor de crecimiento fibroblástico básico); GDF-9 (factor de crecimiento y diferenciación 9); IL-1 β (interleucina 1 β); EGF (factor de crecimiento epidermal); GH (hormona del crecimiento); TGF α (factor de crecimiento transformante- α).

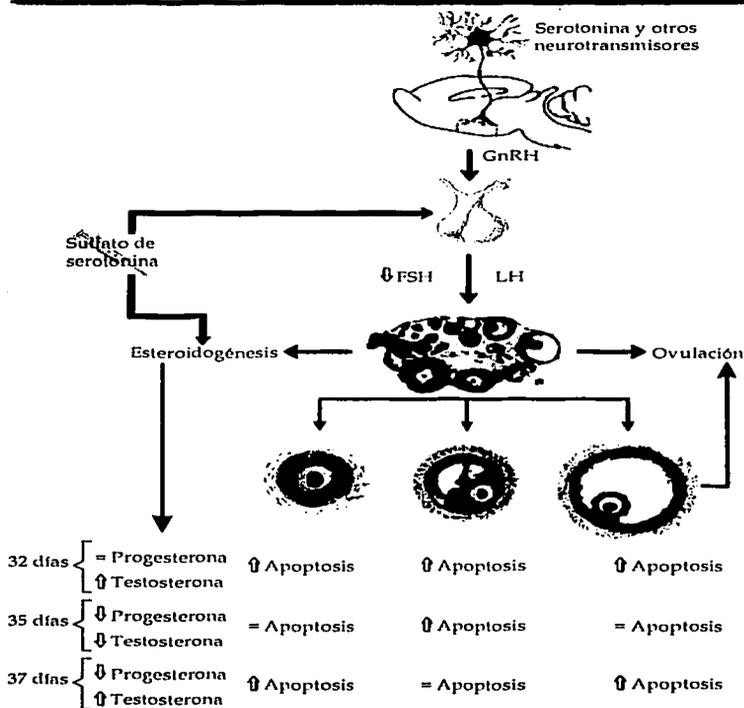


Figura 21. Eventos que se presentan después de la administración de sulfato de serotonina y sacrificados a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

Conclusiones

- En la rata prepúber el aumento en la concentración de serotonina estimula el proceso de apoptosis en las células de la granulosa y como consecuencia la atresia folicular.
- En la rata prepúber la serotonina modifica el proceso de esteroidogénesis, aumenta la producción de testosterona y disminuye la de progesterona.
- En los animales tratados con serotonina, el incremento en el proceso de apoptosis está asociado a los cambios en la producción de hormonas esteroideas sexuales (progesterona y testosterona).

BIBLIOGRAFÍA

Alberts B., Bray D., Jonson A., Lewis J., Raff M., Roberts K. y Walter P. (1999). **Introducción a la Biología Celular**. Ediciones Omega, S.A. Barcelona, España. pp. 1152-1153.

Amsterdam A., Dantes A., Hosokawa K., Schere-Levy CP., Kotsuji K. y Aharoni D. (1998). Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. **Steroids** 63: 314-318.

Ayala ME., Rosas P. y Domínguez R. (1993). Effects of serotonergic blockade provided at different ages on spontaneous and induced puberty in the female rat. **Medical Science Research** 21: 509-511.

Ayala ME., Monroy J., Morales L., Castro ME. y Domínguez R. (1998). Effects of a lesion in the dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period of the female rat, on puberty. **Brain Research Bulletin** 47: 211-218.

Battista PJ. y Condon WA. (1986). Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow luteal cells *in vitro*. **Journal of Reproduction Fert.** 76: 231-238.

Billig H., Furuta I. y Hsueh AJ. (1993). Estrogen inhibit and androgen enhance ovarian granulosa cell apoptosis. **Endocrinology** 133: 2204-2212.

Boone DL., Yan W. y Tsang BK. (1995). Identification of desoxyribonuclease I-like endonuclease in rat granulosa and luteal cell nuclei. **Biology of Reproduction** 53: 1057-1065.

Boone DL. y Tsang BK. (1997). Identification and Localization of Deoxyribonuclease I in the Rat Ovary. **Biology of reproduction** 57: 813-821.

Boone DL. y Tsang BK. (1998). Caspase-3 in the Rat Ovary: Localization and Possible Role in Follicular Atresia and Luteal Regression. **Biology of Reproduction** 58: 1533-1539.

Bouchaud C. (1972). Autoradiographic demonstration of an hamatoencephalic barrier against 5-hydroxitriptamine. **C R Acad Sci Hebd Seances Acad Sci D** 275(9): 975-978.

Boya JU. (1999). **Atlas de Histología y Organografía Microscópica**. Editorial Panamericana. Madrid, España. pp. 418.

Brown RE. (1994). The pituitary gland and its hormones. En: **Neuroendocrinology**. Richard E. Brown (Ed). Cambridge University Press. New York, pp. 30- 39.

Castro ME. (1999). Cambios en la maduración y crecimiento del folículo ovárico, secreción de gonadotropinas esteroides ováricos y monoaminas hipotalámicas durante el desarrollo prepuberal de la rata. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Castro ME., Ayala ME., Monroy J., Chavira R., Damian-Matsumara P. y Domínguez R. (2001). Changes in monoaminergic activity in the anterior, médium and posterior hypothalamus, gonadotropins levels and ovarian hormones during puberty of the female rat. **Brain Research Bulletin** 54: 345-352.

Chun SY., Billig H., Tilly JL., Furuta I., Tsafiri A. y Hsueh AJ. (1994). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like factor I. **Endocrinology** 135: 1845-1853.

Chun SY., Eisenhauer KM., Minami S., Billig H., Perlas E. y Hsueh AJW. (1996). Hormonal Regulation of Apoptosis in Early Antral Follicles: Follicle-Stimulating Hormone as a Major Survival Factor. **Endocrinology** 137: 1447-1456.

Clausell DE. y Soliman FA. (1978). Ovarian serotonin content in relation to ovulation. **Experientia** 34: 410-411.

Cooper GM. (2000). **THE CELL a molecular approach**. 2a edición. Editorial Sinauer Associates. Massachusetts, E.U.A. pp. 560-565.

Döhler KD y Wuttke W. (1975). Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. **Endocrinology** 97: 898-907.

Domínguez R. Chávez R. y Cruz ME. (1991). La regulación del crecimiento y el desarrollo folicular. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. R. Domínguez (Ed.). UNAM-Purrua. México. pp. 163-188.

Dong HD., Kimoto Y., Takai S. y Taguchi T. (1996). Apoptosis as a mechanism of lectin-dependent monocyte-mediated cytotoxicity. **Immunol Invest**. 25(1-2): 65-78.

Erickson GF. y Shimasaki S. (2001). The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertility and Sterility** 76(5): 943-948.

Geneser F. (2000). **HISTOLOGÍA Sobre bases biomoleculares**. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Argentina. pp. 613-629.

Gore-Langton RE. y Armstrong DT. (1994). Follicular Steroidogenesis and Its Control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil y JD Neill (Eds). 2a ed. Raven Press, New York. pp 571-611.

Greenwald GS. y Roy SK. (1994). Follicular development and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. Knobil E. y Neill JD. (Eds.) 2a ed. Raven Press, New York. pp. 629-724.

Ham WA. (1985). **Tratado de Histología**. 8a ed. Editorial Interamericana. México, D.F. pp. 794-801.

Hillier SG. (1994) Hormonal Control of Folliculogénesis and Luteinización. En: **Molecular Biology of the female reproductive system**. Findlay JK (Ed). Academic Press. California, USA. 1-37.

Hirshfield AN. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. **Int. Review of Cytology** 124: 43-101.

Hsu SY. y Hsueh AJ. (1998). Intracellular mechanisms of ovarian cell apoptosis. **Molecular Cell Endocrinology** 145(1-2): 21-25.

Hsueh AJ., Billing H. y Tsafirri A. (1994). Ovarian Follicle Atresia: A hormonally controlled apoptotic process. **Endocrinology Reviews** 15: 707- 723.

Hughes FM., Jr. y Gorospe WC. (1991). Biochemical Identification of Apoptosis (Programmed Cell Death) in Granulosa Cells: Evidence for a Potential Mechanism Underlying Follicular Atresia. **Endocrinology** 129: 2415-2422.

Jennes L, Stumpt WE. y Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. **J. Comp. Neurol.** 232: 534-547.

Kaipia A. y Hsueh AJW. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. **Annual Review of Physiology** 59:349-363.

Kiess W. y Gallaher B. (1998). Hormonal control of programmed cell death/apoptosis. **European Journal of Endocrinology** 138: 482-491.

Kim JM., Yoon YD. y Tsang BK. (1999). Involvement of the Fas/Fas ligand system in p53-mediated granulosa cell apoptosis during follicular development and atresia. **Endocrinology** 140: 2307-2317.

Koninckx PR., Verhoeven G. y De Moor P. (1983). Androgen Secretion by the Stromal Cell of the rat ovary. En: **Factors Regulating Ovarian Function**. Greenwald GS. y Terranova PF. (Eds.). Raven Press. New York, USA.

Kordon C., Javoy F., Vassent G. y Glowinski J. (1968). Blockade of superovulation in the immature rat by increased brain serotonin. **European Journal of Pharmacology** 4: 169-174.

Shanon NJ., Gunnet JW. y Moore KE. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptamine neural activity following electrical stimulation of the raphe nucleus. **Journal of Neurochemical** 47: 959-965.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Kordon C. (1969). Effects on Selective Experimental Changes in Regional Hypothalamic Monoamine Levels on Superovulation in the Immature Rat. **Neuroendocrinology** 4: 129-138.

Krishna A. y Terranova PF. (1985). Alterations in Mast Cell Degranulation and Ovarian Histamine in the Proestrous Hamster. **Biology of Reproduction**. 32: 1211-1217.

Kyprianov N., English HF. y Isaacs JT. (1998). Activation of Ca^{+2} -/ Mg^{+2} dependent endonuclease as an early event in castration induced prostatic cell death. **Prostate** 13: 103-117.

Labhsetwar AP. (1971). Effects of serotonin on spontaneous ovulation in rats. **Nature** 229: 203-204.

Lesson ST. (1985). **Histología**. Editorial Interamericana. México, D.F. pp. 245-249.

Maillet G., Bréard E., Benhaïm A., Leymarie P. y Féral C. (2002). Hormonal regulation of apoptosis in rabbit granulosa cells *in vitro*: evaluation by flow cytometric detection of plasma membrane phosphatidylserine externalization. **Reproduction** 123: 243-251.

Markström E., Svensson EC., Shao R., Svanberg B. y Billig II. (2002). Survival factors regulating ovarian apoptosis-dependence on follicle differentiation. **Reproduction** 123: 23-30.

McGee EA., Hsu SY., Kaipia A. y Hsueh AJ. (1998). Cell death and survival during ovarian follicle development. **Molecular Cell Endocrinology** 140(1-2): 15-18.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Morán MJ., Ayala ME., Monroy J., Damián-Matsumara P. y Domínguez R. (2001). Estudio sobre la participación de la serotonina en la regulación del inicio de la pubertad y la primera ovulación en la rata. En: **XXVI Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción**. pp. 271.

Morita Y. y Tilly JL. (1999). Oocyte Apoptosis: Like Sand through an Hourglass. **Developmental Biology** 213: 1-17.

Noback CR. (1984). **Sistema Nervioso Humano Fundamentos de Neurobiología**. 2ª edición. Ed. McGraw-Hill. México, D.F. pp. 253-264.

Ojeda SR. y Ramírez VD. (1972). Plasma level of FSH and LH in maturing rats: response to gonadectomy. **Endocrinology** 90: 466-472.

O'Steen, WK. (1964). Serotonin supresion of luteinization in gonadotrophin-treated, immature rats. **Endocrinology** 74: 885-888.

O'Steen, WK. (1965). Supresion of ovarian activity in immature rats by serotonin. **Endocrinology** 77: 937-939.

Paxinos G. y Watson C. (1982). **The rat brain in stereotaxic coordinates**. Academic Press. New York, USA.

Peitsch M., Poizar B., Stephan H., Crompton T., Mac Donald HR., Mannberg HG. y Tschopp J. (1993). Characterization of endogenous deoxiribonuclease involved in nuclear DNA degradation during apoptosis (programmed cell death). **EMBO J**. 12(1): 371-377.

Ramaley JA. (1979). Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. **Biology of reproduction** 20: 1-31.

Ross M.H., Lynn JR. y Gordon IK. (1997). **HISTOLOGÍA Texto y Atlas**. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. 87, 224-228.

Schmidth G., Kannisto P., Owman C. y Sjöberg N-O. (1988). Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused *in vitro*?. **Acta Physiol. Scand.** 132; 251-256.

Schwall R y Erickson GF. (1978). Functional and morphological changes in rat theca cells during atresia. En: **Dynamics ovarian function**. Schwartz NB. Y Hunzicker-Dunn M. (Eds). Raven Press. New York, USA. Pp. 29-34.

Takeuchi Y. (1988). Distribution of serotonin in the mammalian brain. En: **Neuronal Serotonin**. MN Osborne y M Hamon (Eds). John Wiley & Sons, New York. pp. 25-56.

Talbot P. y Schroeder PC. (1982). 5-Hydroxytryptamine causes contraction of smooth muscle cells in preovulatory hamster follicles. **Journal of Experimental Zoology** 224: 427-436.

Tanaka E., Baba N., Toshida K. y Suzuki K. (1993). Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. **Life Sci.** 53: 563-70.

Tilly JL., Kowalski KI., Johnson AL. y Hsueh AJW. (1991). Involvement of apoptosis in ovarian Follicular atresia and postovulatory regression. **Endocrinology** 129: 2799-2801.

Tilly JL, Kowalski KL, Schomberg DW, y Hsueh AJW. (1992). Apoptosis in atretic Ovarian Follicles Is Associated with Selective Decreases in Messenger Ribonucleic Acid Transcripts for Gonadotropin Receptors and Cytochrome P450 Aromatase. *Endocrinology* **131**: 1670-1676.

Tilly JL. (1996). Apoptosis and ovarian function. *Reviews of reproduction* **1**: 162-172.

Tilly JL. (1996). The molecular basis of ovarian cell death during germ cell attrition, follicular atresia, and luteolysis. *Frontiers in Bioscience* **1**:1-11.

Wyllie AH, Kerr JFR y Currie AR. (1980). Cell Death: The Significance of Apoptosis. *International Review of Cytology* **68**: 251-305.

Yuan J. (1997). Transducing signals of life and death. *Current Opinion in Cell Biology* **9**:247-251

APÉNDICE A

Obtención de las tres regiones del hipotálamo

Al momento de la autopsia se extrajo el cerebro de las ratas, el cual fue congelado en nitrógeno líquido con el fin de extraer el hipotálamo anterior, medio y posterior. Para ubicar cada una de las regiones del hipotálamo se emplearon como referencia las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982).

Cromatografía de líquidos de alta presión

La cuantificación de serotonina en hipotálamo se realizó por medio de un equipo para cromatografía de líquidos de alta presión (Figura 22), que está constituido de una bomba isocrática (modelo L-250 Perkin Elmer), un sistema degasificador de solventes Degassit (modelo 6322 MetaChem), una columna C-18 fase reversa de 25 cm, 300 Å de tamaño de poro 4.6 mm de diámetro interno (marca VYDAC-IECSA), un detector electroquímico amperimétrico LC-4C (BAS) y un integrador Nelson 1020 (Perkin Elmer). La fase móvil consistió de una solución de 15.75 g de ácido cítrico disuelto en agua desionizada (pH 3), a la cual se le agregaron 200 mg de ácido 1-octano sulfónico. La solución se filtró pasándola a través de filtros millipore de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0.22 µm, posteriormente se le adicionó 20 ml de acetonitrilo y 25 ml de tetrahidrofurano.

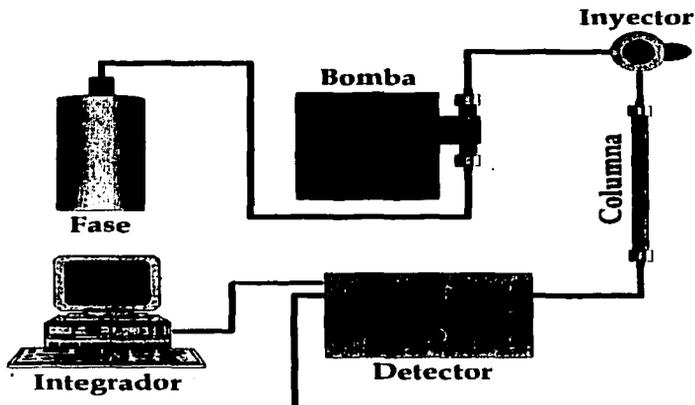


Figura 22. Diagrama del sistema de cromatografía de líquidos de alta presión con sus componentes principales.

Preparación de soluciones

Se prepararon soluciones de referencia de cada uno de los neurotransmisores a cuantificar (noradrenalina, dopamina y serotonina) y sus metabolitos (4-hidroxi-3-metoxifenil glicol, ácido 3-4-dihidroxifenil acético y ácido 5-hidroxiindol acético) en una concentración de 1 mg/2 ml de ácido perclórico, y se almacenaron a -70°C .

- Se adicionaron 50 μl de cada uno de los neurotransmisores y sus metabolitos en un matraz aforado de 10 ml y se aforó con ácido perclórico (solución A).
- De la solución A se tomaron 50 μl y se colocaron en un tubo eppendorf y después se agregaron 1200 μl de ácido perclórico para tener una

concentración final de 2 ng/ml (solución B).

- 500 μ l de la solución B se diluyeron en 500 μ l de ácido perclórico y la concentración final de la solución fue de 1 ng/ml (solución C).
- De la solución C se tomaron 500 μ l y se les adicionó 500 μ l de ácido perclórico para tener una solución con una concentración de 0.5 ng/ml (solución D).

Estas soluciones fue inyectada en el aparato de HPLC para obtener una curva patrón a partir de la cual se calcularon las concentraciones de los neurotransmisores y sus metabolitos en las muestras de cerebro de las ratas testigo o que recibieron solución salina o serotonina.