



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Estudios Superiores
"Zaragoza"

PARTICIPACIÓN DE LA SEROTONINA EN LOS MECANISMOS QUE
REGULAN EL PROCESO DE ATRESIA Y APOPTOSIS EN EL OVARIO
DE LA RATA DURANTE LA ETAPA PREPUBERAL

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)

P R E S E N T A

ELOIR

GALLEGOS

PACHECO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2007



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.

RECONOCIMIENTOS

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología** por el apoyo financiero otorgado en la beca de maestría.

Durante el desarrollo de la tesis se contó con el apoyo financiero de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico**, proyecto **IN 206805**

A los miembros del Comité Tutorial:

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

AGRADECIMIENTOS

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

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Dra. María Eugenia Mendoza Garrido

Dra. Margarita Virginia González del Pliego Olivares

Por sus valiosas aportaciones durante la realización y revisión de esta tesis.

Al Dr. Pablo Damián Matsumura del departamento de Biología de la Reproducción de la UAM-Iztapalapa por su ayuda en la implementación de la técnica de RT-PCR.

Al Biol. Roberto Chavira del laboratorio de hormonas esteroides del INCMN “Salvador Zubirán” por su colaboración en la realización de la técnica de radioinmunoanálisis.

A María Luisa Illescas Vera por su colaboración técnica en el estudio histológico y por su amistad.

A Juanita, Juan Luis, Diana, Julio, Jessica, Daniel, Maritza, Andrea y Concepción por crear un agradable ambiente de trabajo en el laboratorio de pubertad.

A todas las personas que conforman la Unidad de Investigación de Biología de la Reproducción.

A Adriana y todo el personal del bioterio de la FES-Zaragoza, por su valiosa cooperación en el mantenimiento de los animales.

Dedicatorias

A mis padres, Sergio y Gabriela, que siempre han estado conmigo y me han apoyado en todo momento.

A mis hermanos, Maribel y Hugo, por ser los mejores hermanos y estar siempre conmigo.

A mis primos Miguel, José, Ivonne, René, Karina y Raúl, porque siempre serán parte importante de mi vida.

A mis abuelitos, porque se que siempre estarán conmigo.

A toda mi familia, porque se que estarán conmigo cuando lo necesite.

A Juanita, Diana, Juan Luis, Julio, Jessica y Daniel, quienes han estado siempre para recordarme que soy capaz de realizar mas de lo que yo pienso.

A mis amigos Flor, Claudia P, Lalo, Y adira, Miguel, Claudia G, I nés, Miriam, Iván, Gris y Hernán, porque este camino lo comenzamos juntos, y hemos seguido juntos a pesar de los problemas.

A Carlos, Erika, Javier, Lety, Erik, Alice y Ricardo, por permitirme ser parte de su grupo y brindarme su amistad.

A Luisa, Cesar, Aarón, Daniel Giovanni, Gina, Roberto, Jimena y Manuel, que siempre estarán presentes en este escenario al que llamamos vida.

A todas las personas que han formado parte de mi vida y me han impulsado a ser lo que soy. Gracias

ÍNDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES	4
PUBERTAD	4
OVARIO	8
ESTEROIDOGÉNESIS	8
FOLICULOGÉNESIS	10
ATRESIA FOLICULAR	14
APOPTOSIS	18
LA FAMILIA BCL-2	24
SEROTONINA Y FUNCIONES DEL OVARIO	25
JUSTIFICACIÓN	33
HIPÓTESIS	34
OBJETIVO GENERAL	35
OBJETIVOS PARTICULARES	35
MATERIALES Y MÉTODO	36
RESULTADOS	43
EFFECTO DE LA ADMINISTRACION DE SEROTONINA POR VIA SISTÉMICA	43
CONCENTRACIÓN DE ESTEROIDES Y GONADOTROPINAS	43
EXPRESIÓN DE BCL-2 Y BAX	43
EVALUACIÓN DE LA APOPTOSIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TUNEL	44
ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	49
EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE SEROTONINA EN LA BURSA DEL OVARIO	55
CONCENTRACIÓN DE ESTEROIDES EN SUERO	55
DISCUSIÓN	59
CONCLUSIONES	73
PERSPECTIVAS	74
BIBLIOGRAFÍA	75
APÉNDICES	85

RESUMEN

La serotonina participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, la esteroidogénesis y la ovulación. Las gonadotropinas y las hormonas esteroides regulan el desarrollo del folículo ovárico y el proceso de muerte por apoptosis de las células de la granulosa. En estudios previos se ha mostrado que la administración de serotonina durante la etapa prepuberal aumenta la incidencia de atresia, por lo que, en el presente estudio se evaluó si este efecto es resultado de la acción de la serotonina sobre el proceso de apoptosis al modificar la síntesis de hormonas esteroides o la liberación de las gonadotropinas. Para ello se administró sulfato de serotonina a ratas de 30 días de edad por vía sistémica o directamente en la bursa del ovario, para posteriormente cuantificar gonadotropinas y hormonas esteroides en suero, así como la evaluación del proceso de apoptosis con la expresión de los genes bcl-2 y bax, actividad de la caspasa 3 y la fragmentación de ADN por la técnica de TUNEL, así como la evaluación de la atresia folicular mediante la identificación de características como la picnosis de células de la granulosa, descamación de células al antro y alteración en la morfología del ovocito en cortes teñidos con hematoxilina-eosina.

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en los animales tratados con sulfato de serotonina (37.5mg/Kg de peso corporal) y sacrificados 120 horas después del tratamiento la concentración de progesterona fue menor (23.9 ± 2.1 vs. 9.2 ± 0.9 , $p < 0.05$). La concentración en suero de 17β -estradiol fue menor en los animales tratados con serotonina a partir de las 18 horas hasta las 168h pos tratamiento (18h: 30.6 ± 3.2 vs. 21.1 ± 2.1 ; 24h: 18.1 ± 1.1 vs. 14.4 ± 0.6 ; 48h: 17.4 ± 0.9 vs. 12.2 ± 1.6 ; 120h: 11.3 ± 2.7 vs. 6.2 ± 1.3 ; 168h: 26.9 ± 8.0 vs. 13.4 ± 2.5 , $p < 0.05$). La concentración de FSH en el suero de los animales que se inyectaron con sulfato de serotonina fue mayor a las 12, 24, 48 y 120 horas (12h: 1.2 ± 0.1 vs. 2.4 ± 0.2 ; 24h: 1.3 ± 0.1 vs. 2.5 ± 0.2 ; 48h: 1.9 ± 0.1 vs. 2.5 ± 0.2 ; 120h: 1.9 ± 0.3 vs. 2.7 ± 0.3 , $p < 0.05$). Mientras que, la concentración de la LH fue menor en los animales sacrificados a las 24, 48, 120 y 168 horas (24h: 32 ± 7 vs. 23 ± 3 ; 48h: 30 ± 12 vs. 10 ± 1 ; 120h: 31 ± 4 vs. 10 ± 1 ; 168h: 33 ± 5 vs. 12 ± 3 , $p < 0.05$).

La expresión del gen bcl-2 fue mayor a las 24 y 48 horas después de iniciado el tratamiento (24h:5.0±1.2 vs. 9.3±1.2; 48h:6.4±0.6 vs. 9.5±1.4, p<0.05). La expresión del gen bax fue mayor a las 24 horas después de iniciar el tratamiento (5.9±0.5 vs. 8.8±0.8, p<0.05). La actividad de la caspasa 3 fue mayor a las 24 horas después de haber iniciado el tratamiento (2.1±1.5 vs. 6.6±2.4, p<0.05). Cuando se realizó la evaluación de apoptosis por TUNEL la proporción de folículos clase 1 (<275 µm) con apoptosis fue mayor en los animales sacrificados a las 24, 48, 120 y 168 horas (24h:5.3±0.5 vs. 14.6±4.4; 48h:16.3±2.0 vs. 55.7±3.7; 120h:20.8±0.3 vs. 45.0±7.0; 168h:22.7±6.6 vs. 46.3±2.3, p<0.05). En los folículos de clase 2 (275-450 µm) la proporción de células con apoptosis fue mayor a las 120 horas (9.9±2.8 vs. 27.8±6.1, p<0.05), y en los folículos de clase 3 (>450 µm) fue mayor a las 120 y 168 horas (120h:0.6±0.6 vs. 5.7±1.1; 168h:1.3±0.4 vs. 8.6±3.6, p<0.05). La proporción de folículos atrésicos fue mayor a las 168 horas (26.6±2.5 vs. 47.3±3.6, p<0.05).

La concentración de progesterona de los animales que recibieron serotonina en la bursa del ovario (1mgx40µl-1/ovario) fue mayor a las 6 y 48 horas pos-tratamiento (6h:12.2±1.5 vs. 18.1±1.6; 48h:10.2±3.9 vs. 21.4±4.3, p<0.05), mientras que la de testosterona fue menor a las 12 y 48 horas (12h: 40.7±8.5 vs. 10.8±3.7; 48h: 38.0±6.8 vs. 23.5±1.0, p<0.05), y la de estradiol fue menor a las 12 y 24 horas (12h:28.6±2.9 vs. 16.8±0.9; 24h: 24.8±2.0 vs. 17.2±0.4, p<0.05).

Estos resultados nos permiten pensar que la serotonina, administrada por vía sistémica, participa en la regulación del proceso de atresia folicular, al inducir el proceso de muerte celular por apoptosis de las células de la granulosa, y modificar la secreción de gonadotropinas y de hormonas esteroides, y como consecuencia la atresia folicular. El aumento de apoptosis resulta de la disminución de hormonas que actúan como factores de sobrevivencia (estradiol y hormona luteinizante). Mientras que, al administrar la serotonina en la bursa del ovario modifica la síntesis de hormonas esteroides, y disminuye la concentración sérica de 17β-estradiol.

SUMMARY

The serotonin participates in the regulation of gonadotrophin secretion, steroidogenesis and the ovulation. The gonadotropins and steroids are the regulators of follicular development and the death of granulosa cells for apoptosis. We have previously shown that the administration of serotonin sulphate to prepuberal female rats increase the follicular atresia. Based on these evidences, we investigate whether serotonin induces apoptosis in granulosa cells and if this effect is related to the changes on the levels of ovarian steroids and gonadotropins. We decided to analyse the effects of the administration of serotonin sulphate systemically or directly into ovarian bursa on 30-day old rats, to determine whether the increase of serotonin affects the levels of gonadotropins, ovarian steroids and apoptosis evaluated by the expression of bcl-2 and bax gene, and the DNA fragmentation evaluated by the TUNEL technique. Also examined the follicular atresia based on morphological criteria as piknosis in granulose cells surrounding the antrum; hypertrophy of the theca interne and signs of degeneration in the oocyte.

In comparison with the control group, the concentration of progesterone was lower in the animals injected with serotonin sulphate and sacrificed 120 hours after the treatment (23.9 ± 2.1 vs. 9.2 ± 0.9 , $p < 0.05$). A increase in the concentration of 17β -estradiol was observed between the 18 and 168 hours after treatment (18h: 30.6 ± 3.2 vs. 21.1 ± 2.1 ; 24h: 18.1 ± 1.1 vs. 14.4 ± 0.6 , 48h: 17.4 ± 0.9 vs. 12.2 ± 1.6 ; 120h: 11.3 ± 2.7 vs. 6.2 ± 1.3 ; 168h: 26.9 ± 8.0 vs. 13.4 ± 2.5 , $p < 0.05$). Serum concentration of FSH were significantly higher in the animals injected with serotonin creatinine sulphate and sacrificed 12, 24, 48 or 120 hours after the treatment (12h: 1.2 ± 0.1 vs. 2.4 ± 0.2 ; 24h: 1.3 ± 0.1 vs. 2.5 ± 0.2 ; 48h: 1.9 ± 0.1 vs. 2.5 ± 0.2 ; 120h: 1.9 ± 0.3 vs. 2.7 ± 0.3 , $p < 0.05$). While, the concentration of LH were lower on the animals sacrificed 24, 48, 120 or 168 hours (24h: 32 ± 7 vs. 23 ± 3 ; 48h: 30 ± 12 vs. 10 ± 1 ; 120h: 31 ± 4 vs. 10 ± 1 ; 168h: 33 ± 5 vs. 12 ± 3 , $p < 0.05$).

The expression of the gene bcl-2 on the rats injected with serotonin sulphate was significantly higher than in control animals sacrificed 24 or 48 hours after treatment (24h: 5.0 ± 1.2 vs. 9.3 ± 1.2 ; 48h: 6.4 ± 0.6 vs. 9.5 ± 1.4 , $p < 0.05$). The expression of gene

bax increased to 24 hours (5.9 ± 0.5 vs. 8.8 ± 0.8 , $p < 0.05$). The activity of caspase 3 was higher to 24 hours after the injection of serotonin sulphate (2.1 ± 1.5 vs. 6.6 ± 2.4 , $p < 0.05$).

In comparison with the control group, an increase on the percentage of follicles class 1 ($< 275 \mu\text{m}$ of diameter) with apoptosis was observed on the rats sacrificed to 24, 48, 120 or 168 hours (24h: 5.3 ± 0.5 vs. 14.6 ± 4.4 ; 48h: 16.3 ± 2.0 vs. 55.7 ± 3.7 ; 120h: 20.8 ± 0.3 vs. 45.0 ± 7.0 ; 168h: 22.7 ± 6.6 vs. 46.3 ± 2.3 , $p < 0.05$). In the follicles class 2 ($275\text{-}450 \mu\text{m}$) the apoptosis in granulosa cells was increased to 120 hours (9.9 ± 2.8 vs. 27.8 ± 6.1 , $p < 0.05$), in the follicles class 3 ($> 450 \mu\text{m}$) was higher to 120 and 168 hours (120h: 0.6 ± 0.6 vs. 5.7 ± 1.1 ; 168h: 1.3 ± 0.4 vs. 8.6 ± 3.6 , $p < 0.05$). The percentage of atretic follicles increased in those animals sacrificed to 168 hours after injection of serotonin (26.6 ± 2.5 vs. 47.3 ± 3.6 , $p < 0.05$).

Compared with the control group, on the animals with injection of serotonin sulphate in the ovarian bursa ($1\text{mg}/40\mu\text{l-1}/\text{ovary}$) a significant rise in progesterone serum levels was observed 6 and 48 hours after (6h: 12.2 ± 1.5 vs. 18.1 ± 1.6 ; 48h: 10.2 ± 3.9 vs. 21.4 ± 4.3 , $p < 0.05$), while the testosterone serum levels were lower to 12 and 48 hours after treatment (12h: 40.7 ± 8.5 vs. 10.8 ± 3.7 ; 48h: 38.0 ± 6.8 vs. 23.5 ± 1.0 , $p < 0.05$). The concentration of 17β -estradiol decreased on the animals sacrificed 12 or 24 hours after injection of serotonin (12h: 28.6 ± 2.9 vs. 16.8 ± 0.9 ; 24h: 24.8 ± 2.0 vs. 17.2 ± 0.4 , $p < 0.05$).

The results presented herein suggest that in the prepuberal rats the serotonin increase the follicular atresia in the ovary, which can be related to the increased of the death of granulosa cells for apoptosis, induced by the modifications on the gonadotropin and steroids serum concentrations, in particular to the decrease in 17β -estradiol. However we can not discard the possibility that the serotonin acting directly on the ovary modifying the steroidogenesis and the follicular grown.

INTRODUCCIÓN

Las funciones del ovario, como la secreción de hormonas esteroides y producción de folículos que llegarán a liberar su ovocito durante la ovulación, son reguladas entre otros factores por las gonadotropinas [hormona luteinizante (LH) y folículo-estimulante (FSH)], cuya secreción es modulada por el hipotálamo vía la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y por las hormonas secretadas por el propio ovario. Los neurotransmisores (serotonina, catecolaminas y neuropeptidos) interactúan entre ellos o con los esteroides gonadales y participan en la modulación de la secreción de la GnRH y las gonadotropinas (Brown, 1994).

Aunque muchos folículos inician su crecimiento no todos llegan a completar su maduración y son eliminados antes de que liberen su ovocito, proceso conocido como atresia folicular, el cual se ha sugerido es resultado de la muerte de las células por apoptosis (Erickson y Shimasaki, 2001). En relación a esto, Tilly y colaboradores (1991) mostraron que en los folículos atrésicos el ácido desoxirribonucleico (ADN) de las células de la granulosa y de la teca interna se fragmenta y se observa el patrón de bandas en escalera de la misma forma que en las células que mueren por apoptosis. También se ha mostrado en cortes histológicos de ovario de la mujer teñidos por la técnica de TUNEL, que en los folículos primordiales y primarios se presenta apoptosis en las células de la granulosa o en el ovocito, resultando en la atresia de estos folículos y en consecuencia la disminución de los folículos que inician su desarrollo (Depalo y col., 2003).

En estudios previos se ha mostrado que las hormonas esteroides pueden inhibir o inducir la muerte celular por apoptosis en las células de la granulosa, donde los andrógenos inducen la apoptosis, mientras que los estrógenos y la progesterona la inhiben (Oliver y col., 1999).

Uno de los mecanismos de regulación del proceso de apoptosis es aquel en el cual se encuentran involucrados miembros de la familia de genes conocida como Bcl-2, a partir de los cuales se sintetizan proteínas pro y anti-apoptóticas que interactúan en la superficie de la mitocondria y regulan la muerte celular por apoptosis (Antonsson y Martinou, 2000). La familia Bcl-2 también regula la activación de una familia de proteasas, las caspasas, que forman parte de una cascada de señalización intracelular involucrada en el proceso de apoptosis. Entre estas se encuentra la caspasa 3, la que se considera una caspasa efectora debido a que desencadena una serie de eventos que culminan con la fragmentación del ADN y el reconocimiento de la célula por los macrófagos (Boone y Tsang, 1998).

Se ha mostrado que la serotonina participa en la regulación del proceso de apoptosis en diversos órganos o tejidos, tales como en el pulmón, riñón, las células endoteliales, neuronas, etc. (Kim y col., 1999; Pakala y col., 1997; Whitaker-Azmitia y col., 2001). En neuronas mantenidas en cultivo, la estimulación del receptor de serotonina tipo 1 (5-HT₁) inhibe el proceso de apoptosis, mientras que la estimulación del receptor 5-HT₂ induce la muerte por apoptosis (Azmitia, 2001).

La serotonina que se localiza en el ovario se origina en los mastocitos y las plaquetas (Veselá y col., 2003). Se ha sugerido que la serotonina participa en la regulación de las funciones del ovario, tanto en la esteroidogénesis, como en el crecimiento y la diferenciación del folículo y la ovulación (O'Steen, 1965; Wilson y col., 1986; Tanaka y col., 1993). En estudios *in vivo* e *in vitro* en los que se han empleado agonistas o antagonistas de los receptores a serotonina del tipo 5-HT₁ y 5-HT₂ se muestra que esta amina participa en la regulación de la esteroidogénesis por el ovario, estimulando la producción de progesterona, testosterona y estradiol (Schmidt y col., 1988).

En ratas hembra de 30 días de edad tratadas diariamente con sulfato de serotonina (37.5mg/Kg de peso corporal), se bloqueó la ovulación, se incrementó la población de folículos preovulatorios y del índice de atresia folicular. Estos hechos permitieron proponer que la serotonina participa en la modulación del crecimiento y la maduración del folículo ovárico que culmina con la primera ovulación (Morán y col., 2001). Sin embargo, no es posible discernir si estos resultados se deben a la acción directa de la serotonina en el ovario o a su acción en el hipotálamo al modificar la secreción de gonadotropinas.

Es posible que esta amina además de actuar en el hipotálamo y como consecuencia en la producción de gonadotropinas, también actúe directamente en la gónada modulando su funcionamiento. Sin embargo, no existen evidencias que aborden el estudio de la relación que existe entre la serotonina y la modulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. Por ello, en el presente estudio se analizan los efectos de la administración sistémica o localizada de sulfato de serotonina en la esteroidogénesis, atresia folicular y apoptosis en la rata prepúber.

ANTECEDENTES

La reproducción es el proceso mediante el cual se generan nuevos seres a partir de los organismos ya existentes, lo que asegura la preservación de las especies. En la hembra de los roedores el inicio de la actividad reproductiva, pubertad, se inicia con la canalización de la vagina, que en el caso de la rata se presenta alrededor del día 40. Antes del inicio de la pubertad se establecen diversos mecanismos que regulan las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario responsables de que el ovario lleve a cabo sus funciones (Ojeda y Urbanski, 1994; Pinilla, 1999).

PUBERTAD

Ramírez (1973) define la pubertad como la fase biológica que une a la madurez y la inmadurez sexual. Durante el desarrollo prepuberal se produce una serie de cambios fisiológicos que culminan con el inicio de la actividad reproductora. La pubertad también ha sido definida como el periodo de desarrollo sexual secundario que culmina con la fertilidad y su inicio varía en cada especie (Ramaley, 1979). En la rata hembra, la única señal externa de que se ha iniciado la pubertad es la canalización de la vagina, que es precedida por la primera ovulación (Ojeda y Urbanski 1994). La maduración sexual y fertilidad completa se alcanza durante la pubertad, y es el resultado de una serie de eventos que inician desde el establecimiento de la interrelación anatómica y funcional del eje hipotálamo-hipófisis-gonada y culmina con el establecimiento de las funciones reproductoras (Pinilla, 1999).

En el hipotálamo se producen hormonas y factores estimulantes e inhibidores que regulan la secreción de las hormonas adenohipofisarias, entre las que se encuentran la FSH y LH, y a su vez, estas hormonas regulan el funcionamiento del

ovario. Además las funciones del ovario también son reguladas directamente por el sistema nervioso central mediante señales neurales que llegan al este órgano.

Durante el desarrollo prepuberal de la rata se llevan a cabo varios eventos que conducen a la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, entre los cuales se encuentran involucradas modificaciones en las funciones y la estructura de la propia gónada. En esta etapa la síntesis de hormonas esteroides por el ovario responde a la acción de las gonadotropinas, lo cual prepara a los ovarios para que respondan al aumento en la secreción de LH y FSH y que se lleve a cabo la maduración de los folículos ováricos y la ovulación (Figura 1) (Rameley, 1979).

Con base en parámetros morfológicos y funcionales, Ojeda y Urbanski (1994) han dividido para su estudio el desarrollo prepuberal de la rata en cuatro etapas: neonatal, infantil, juvenil y peripuberal (Figura 1).

Etapa neonatal: se extiende desde el día del nacimiento hasta el día siete posnatal. Se caracteriza por la inmadurez de los elementos que componen al eje hipotálamo-hipófisis-ovario, es decir, en esta etapa aún no están bien establecidos los mecanismos que regulan el funcionamiento de este eje como ocurre en la edad adulta (Ramaley, 1979).

Etapa infantil. Abarca del día ocho al 21 de edad. En esta etapa aumenta la secreción de la FSH y la concentración sanguínea más alta se alcanza entre los días 12 y 15 de vida y desciende alrededor del día 20 de edad. La concentración de LH durante esta etapa se mantiene baja en comparación con la concentración que alcanza antes de la primera ovulación, sin embargo, presenta pulsos de secreción durante la tarde (Eshkol y col., 1970; Peters, 1979).

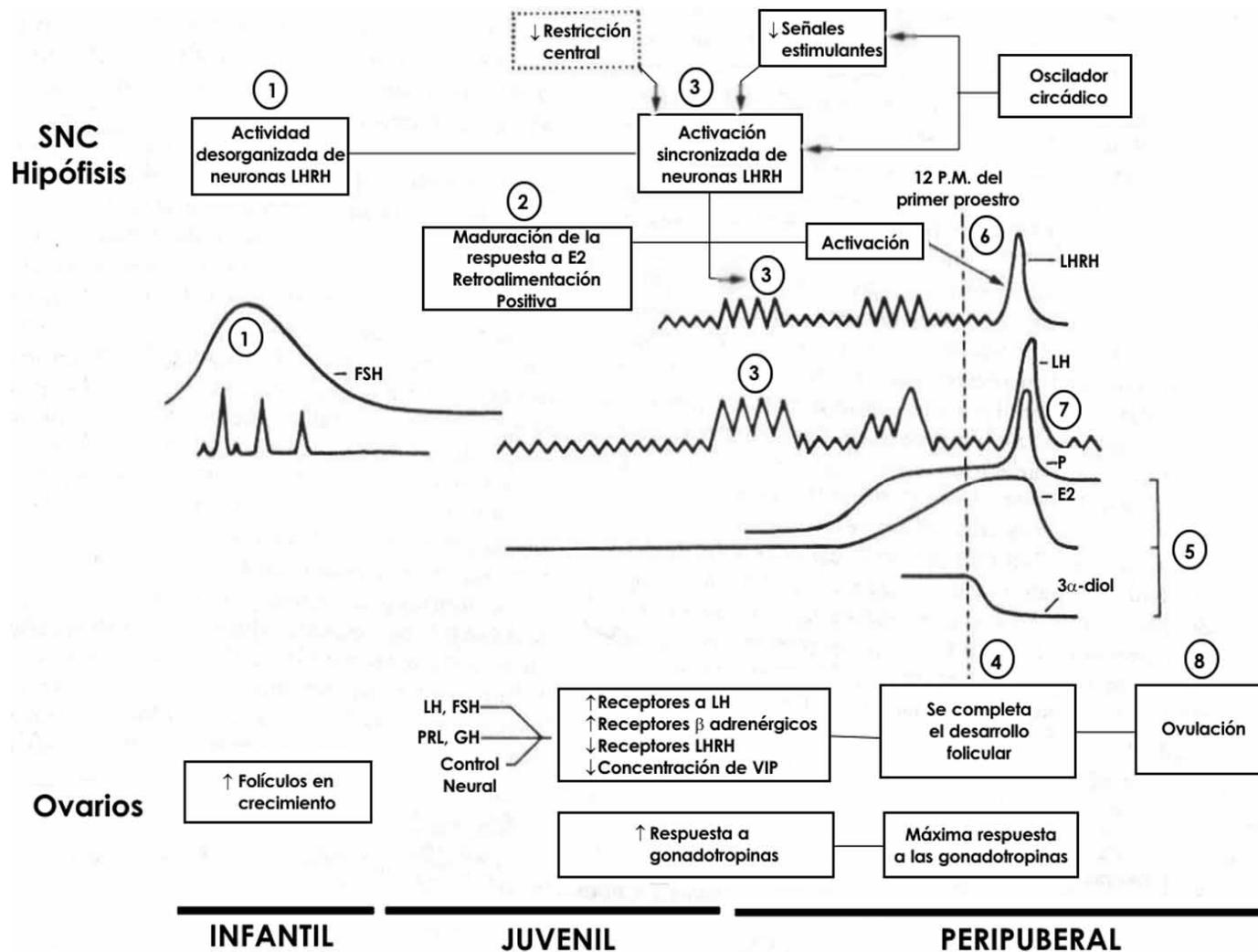


Figura 1. Esquema en el que se representan los principales eventos que se llevan a cabo durante las etapas infantil, juvenil y la etapa peripuberal que culminan con la primera ovulación en la rata. LHRH (hormona liberadora de la LH), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona estimulante del foliculo), E₂ (estrógenos), P (progesterona), PRL (prolactina), GH (hormona del crecimiento) y VIP (péptido intestinal vasoactivo). Los números indican la secuencia en la que se presentan los eventos (Modificado de Ojeda y Urbanski, 1994).

Etapa juvenil. Abarca del día 22 y hasta los días 30-32. En este tiempo las neuronas que producen la GnRH presentan un patrón de secreción diurno y, por ello, la secreción basal de la LH aumenta durante la tarde y se establece el ritmo circadiano de secreción de esta hormona. Estos cambios hormonales estimulan al ovario a producir más estradiol. Durante esta etapa, las concentraciones de FSH y de alfa-fetoproteína en plasma siguen disminuyendo, mientras que aumenta la concentración de estrógenos (Schwartz, 1974). Durante esta etapa se produce la secreción pulsátil de la FSH, es decir que su secreción aumenta en diferentes momentos durante el día. Estos pulsos parecen ser dependientes de los estrógenos y al parecer contribuyen a la iniciación de la gametogénesis y la esteroidogénesis como en el animal adulto (Ramaley, 1979).

En el ovario, los folículos primordiales inician su desarrollo en grupos, evento conocido como reclutamiento inicial. Estos folículos no pueden continuar su desarrollo hacia folículos antrales si no reciben un estímulo adecuado de gonadotropinas que les permita continuar su desarrollo hacia folículos preovulatorios, evento que se conoce como reclutamiento cíclico. Al final de esta fase, la concentración de FSH comienza a disminuir, posiblemente como resultado de los mecanismos de retroalimentación inhibitoria provocados por las hormonas esteroides (Rameley, 1979; McGee y Hsueh, 2000).

Etapa peripuberal. Su duración es variable, inicia alrededor de los días 30-32 y culmina con el inicio de la pubertad. Esta fase se caracteriza porque continúa el aumento en la secreción de las hormonas esteroides, principalmente del estradiol, que es necesario para que se lleve a cabo la canalización de la vagina. Al finalizar esta etapa, los estrógenos secretados por el ovario activan al hipotálamo y como consecuencia aumenta la secreción de la GnRH y, por tanto de las gonadotropinas hipofisarias. El aumento en las concentraciones plasmáticas de estas hormonas se

acompaña de la aceleración del crecimiento y la maduración folicular, lo que culmina con la primera ovulación en la mañana del estro (Ojeda y Urbanski, 1994).

OVARIO

En el ovario se distinguen dos regiones que son la médula y la corteza. La primera se encuentra en la porción central y está formada por tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos y linfáticos, nervios noradrenérgicos y peptidérgicos que penetran y salen por el hilio del ovario, y microganglios. La corteza se localiza en la región periférica del ovario, rodeando la médula y contiene los folículos ováricos en sus diferentes etapas de desarrollo. El tejido que rodea los folículos está constituido por fibras aisladas de músculo liso, así como también tejido conectivo, el cual se diferencia para formar la teca externa del folículo (Figura 2) (Ham, 1985; Boya, 1999; Dailey, 1999).

El ovario lleva a cabo dos funciones interrelacionadas que son la maduración y liberación de los óvulos, así como la síntesis de las hormonas (esteroides sexuales y proteicas) y factores de crecimiento. Las hormonas esteroides sexuales producidas por los ovarios son el estradiol (en las células de la granulosa), la progesterona y la testosterona (en las células de la teca) (Ross y col., 1997; Erickson y Shimasaki, 2001).

ESTEROIDOGÉNESIS

En la síntesis de los estrógenos participan dos células del folículo, las células de la teca y de la granulosa. En los mamíferos, en las células de la teca interna el colesterol se transforma a progesterona, a partir de la cual se forman los andrógenos (androstenediona, testosterona o ambas). La LH, al unirse a su receptor de membrana en las células de la teca, activa a las proteínas G, activa a la adenilato ciclasa, estimula la formación del adenosin monofosfato cíclico (AMPC) y desencadena la cascada de eventos que conducen a la activación de la enzima P450_{scc}, que transforma al

colesterol en progesterona, y de la $P45017\alpha$, que participa en la transformación de la progesterona en andrógenos, los cuales se difunden a las células de la granulosa en donde son aromatizados a estrógenos. La transformación de los andrógenos a estrógenos en la célula de la granulosa es estimulada por la FSH y la LH, mediante la formación del AMPc, que desencadena la secuencia de eventos que culminan con la activación de la enzima aromatasa y la formación de estrógenos, los cuales actúan en el propio folículo y también difunden a la circulación general (Figura 3) (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Erickson y Shimasaki, 2001).

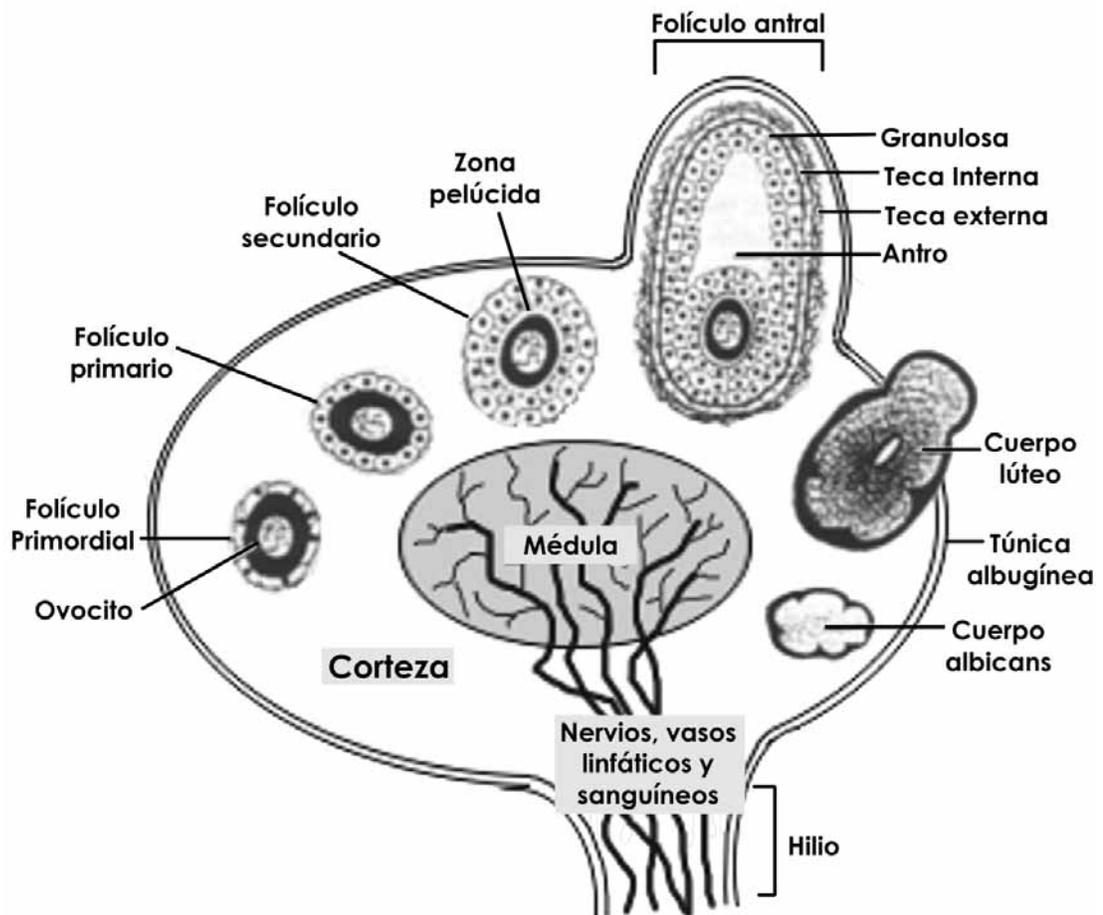


Figura 2. Esquema del ovario de mamífero donde se observan los folículos en diferentes etapas de su desarrollo (Modificado de: Dailey, 1999)

La concentración de las hormonas esteroides varía durante el desarrollo prepuberal, pero las concentraciones son bajas en comparación con las alcanzadas en los días previos al inicio de la pubertad. En el animal adulto la síntesis de hormonas esteroides presenta variaciones a lo largo del ciclo estral, ya que la concentración de estrógenos aumenta durante la fase folicular y la de progesterona durante la fase luteal (Ojeda y Urbanski, 1994).

Castro y colaboradores (2001) mostraron que las concentraciones de progesterona y 17β -estradiol en suero se mantienen bajas a lo largo del desarrollo prepuberal de la rata hembra, en comparación con las que se alcanzan al final de la etapa peripuberal (39 días de edad). En los días previos al inicio de la pubertad la concentración de la progesterona y el estradiol aumentan en relación a los primeros días de la etapa peripuberal, posiblemente como resultado del aumento en la concentración de las gonadotropinas. Estos eventos favorecen el crecimiento de los folículos, algunos de los cuales alcanzan la etapa de folículos preovulatorios.

FOLICULOGÉNESIS

La producción de los óvulos esta relacionada con la diferenciación y maduración del folículo ovárico, proceso conocido como foliculogénesis. Este proceso es gradual y se inicia a partir de un folículo primordial, formado durante la vida fetal, que posteriormente se convierte en un folículo en crecimiento primario o secundario, dependiendo del número de capas de células de la granulosa que lo constituyen, y por último en un folículo maduro o de De Graff (Figura 4) (Ross y col., 1997; Castro, 1999; Erickson y Shimasaki, 2001).

La mayoría de los folículos que se encuentran en el ovario son primordiales. Un folículo primordial se compone de un ovocito y una capa circundante de células

epiteliales aplanadas, que corresponde a las futuras células foliculares. El ovocito es una célula grande, redonda, con un núcleo bien definido (Ross, 1997).

Cuando inicia la maduración del folículo primordial éste se transforma en un folículo primario en crecimiento, proceso que se caracteriza por el aumento de tamaño del ovocito y las células foliculares aplanadas adquieren forma cúbica y posteriormente cilíndrica. Estas células, que se denominan células de la granulosa. Las células de la granulosa están separadas del tejido conectivo que las rodea por una membrana basal. Conforme el ovocito crece se forma a su alrededor la zona pelúcida, la cual es una gruesa membrana eosinófila que separa el ovocito de las células de la granulosa circundantes. Al continuar su crecimiento, en el folículo se forma una cavidad en la capa de células de la granulosa, el antro folicular. El folículo con antro bien definido se denomina folículo secundario. Posteriormente el ovocito ocupa una posición excéntrica y es rodeado por células de la granulosa que conforman el *cumulus ooforus*. Alrededor de las células de la granulosa se encuentra una capa de células denominada teca folicular que se diferencia en una región interna y una externa las cuales están irrigadas por una gran cantidad de vasos sanguíneos (Ham, 1985; Geneser, 2000).

En los días previos a la ovulación aumenta el tamaño del folículo, como consecuencia de la acumulación del líquido en el antro. Posteriormente se separan las células de la parte basal del cumulus ooforus y, poco antes de la ovulación, el ovocito, rodeado por la zona pelúcida y una capa de células de la granulosa, que se orientan radialmente, por lo que es denominada corona radiada, flota en el líquido folicular (Lesson, 1985).

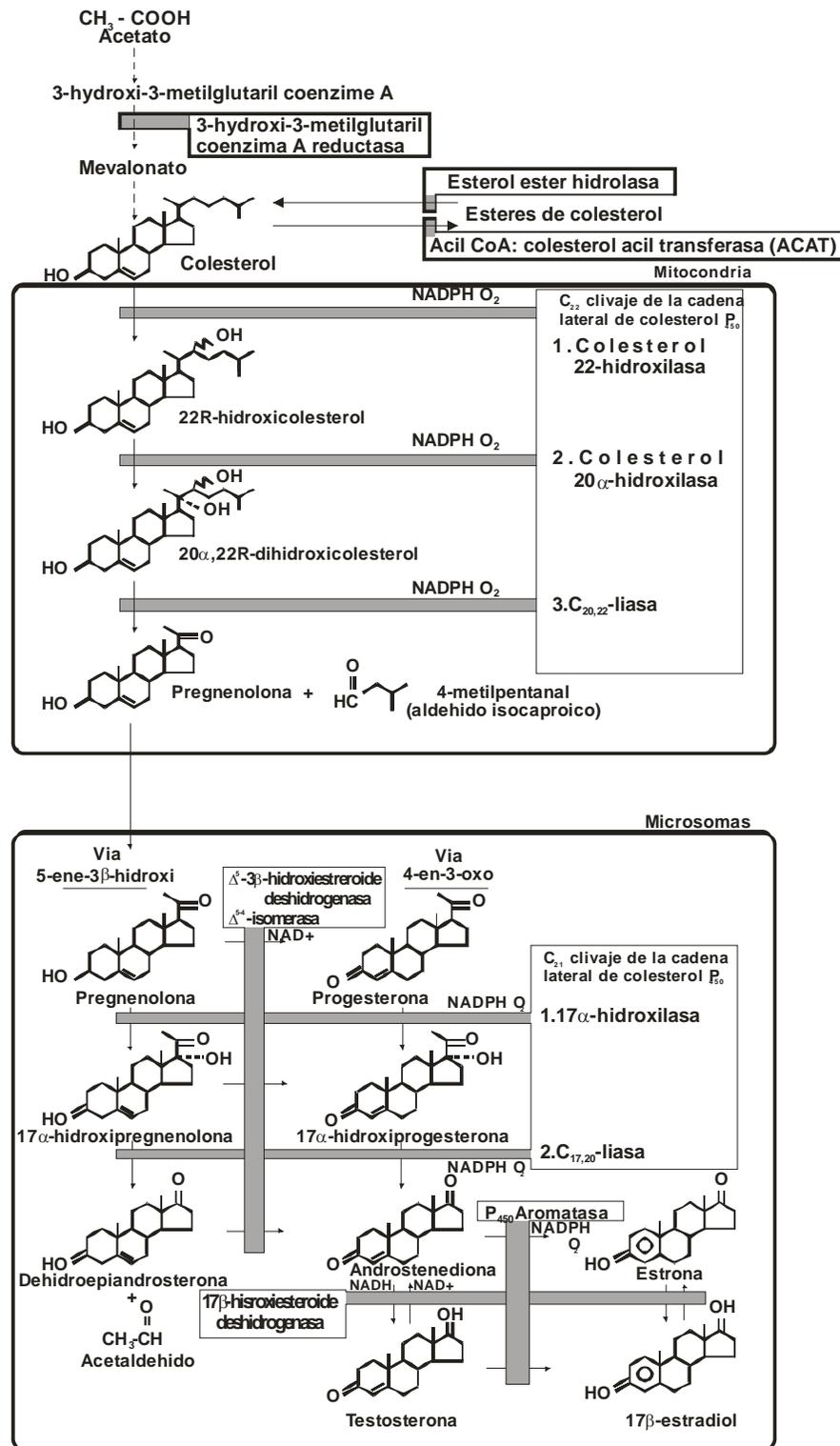


Figura 3. Biosíntesis de las hormonas esteroideas. Guanósil trifosfato (GTP); Guanósil difosfato (GDP); Adenosin monofosfato cíclico (AMPc); Adenosin trifosfato (ATP); Subunidades de la proteína G (α , β , γ); Complejos enzimáticos (P450_{ssc}, P450 aromatasa, P450 17 α) (Modificado de: Erickson y Shimasaki, 2001).

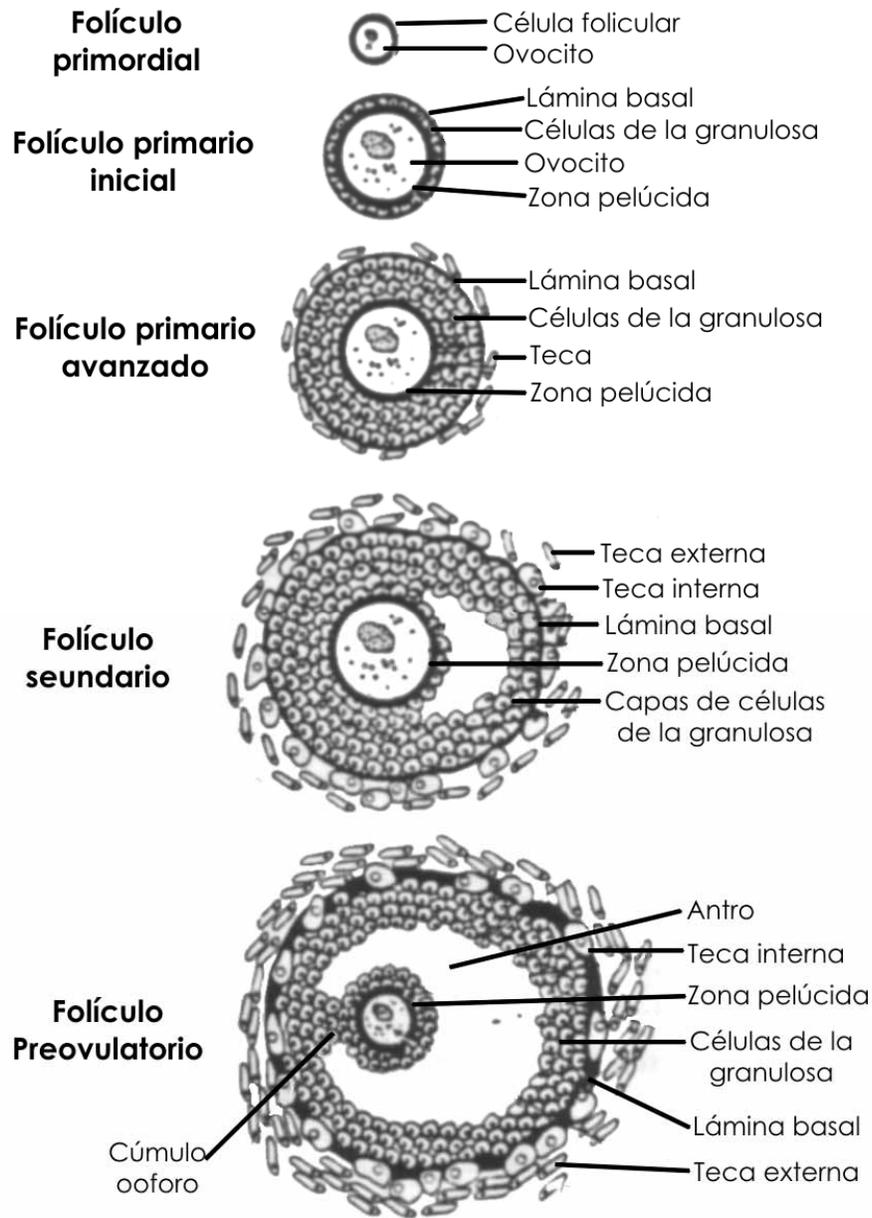


Figura 4. Esquema del desarrollo folicular, desde folículo primordial hasta folículo preovulatorio (folículo de Graff), en el que se observan los tipos celulares y estructuras que lo conforman (Modificado de: Van Voorhis, 1999).

El proceso de foliculogénesis es regulado por diferentes hormonas, tanto de origen ovárico como adenohipofisario. La FSH y la LH son los principales reguladores de la foliculogénesis, la esteroidogénesis, y la ovulación (Hirshfield, 1991; Greenwald y Roy, 1994; Domínguez y col., 1991). Conforme el folículo madura adquiere la capacidad de sintetizar hormonas esteroides, las cuales a su vez participan en la regulación del desarrollo del folículo.

El ovario también sintetiza una gran variedad de sustancias no esteroides como son las prostaglandinas, relaxina, oxitocina, inhibina y factores de crecimiento como IGF-I (Factor de crecimiento parecido a la insulina I), EGF (Factor de crecimiento epidérmico), TGF- α (Factor de crecimiento transformante α), bFGF (Factor de crecimiento fibroblástico básico), entre otros (Ying y Zhang, 1999).

ATRESIA FOLICULAR

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, proceso conocido como atresia folicular y que se presenta en todas las etapas del desarrollo del folículo (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994; Erickson y Shimasaki, 2001). Este proceso se acompaña de la pérdida del ovocito y es el mecanismo principal por el cual disminuye el número de ovocitos en el ovario (Oliver y col., 1999). Se ha reportado que en la rata en el momento del nacimiento el ovario tiene 50000 ovocitos, a las 8 semanas su número disminuye a 8000, de los cuales solo 2100 son ovulados durante la vida fértil del animal (Ryan, 1981).

El aspecto histológico que presenta el folículo atrésico es muy variable. Para caracterizar la atresia se emplean diferentes criterios histológicos, como son: descamación de células de la granulosa hacia el antro folicular, células del cúmulo

flotando en el líquido folicular, células de la granulosa en la zona pelúcida, células de tejido conectivo en el folículo, ruptura de los vasos que irrigan al folículo. En las células de la granulosa se observa cromatolisis y picnosis del núcleo, ausencia de mitosis, en las células de la teca hay hipertrofia y luteinización, y el ovocito presenta picnosis del núcleo, fragmentación de la membrana nuclear y formación de agregados de mitocondrias. Durante la atresia también se presentan algunos cambios funcionales como son: disminución de la expresión de los receptores a las gonadotropinas y disminución en la síntesis de los estrógenos, progesterona y andrógenos. En este proceso el ovocito, las células de la granulosa y de la teca interna presentan modificaciones degenerativas, mientras que la zona pelúcida es más resistente y se altera después (Ryan, 1981).

Los mecanismos por los que se lleva a cabo la muerte de células somáticas y germinales del ovario no son claros. Una posible ventaja evolutiva de la atresia podría ser la selección de los folículos, lo que permitiría que ovulen sólo aquellos con un ovocito saludable. El mecanismo de selección folicular durante el ciclo reproductivo depende de la exposición de los folículos a la FSH durante las etapas críticas del desarrollo (Hsueh y col., 1994). En el ovario de la rata es posible encontrar folículos en todas las etapas de desarrollo, desde primordiales hasta preovulatorios, todos estos folículos están expuestos a cambios constantes de las concentraciones hormonales. Únicamente los folículos que han alcanzado la etapa de folículo secundario y que pueden responder apropiadamente al estímulo de las gonadotropinas y los esteroides circulantes continúan su desarrollo hasta la etapa de folículo antral y maduran completamente, mientras que los que no respondieron al estímulo degeneran por atresia (Farookhi, 1981).

Para la maduración del folículo y la formación de la cavidad antral se requiere de los efectos de la FSH. Esta cavidad es característica de los folículos antrales y preovulatorios. La transformación de los folículos preantrales a antrales no requiere

de altas concentraciones de FSH, sin embargo para que estos folículos continúen su desarrollo es necesaria una alta concentración de esta hormona (Hirshfeld, 1983). Por ello, se le ha atribuido a la FSH un efecto anti atretogénico del folículo y de sobrevivencia de las células de la granulosa, y se ha mostrado que la degeneración folicular durante la etapa prepuberal se asocia a bajas concentraciones de esta hormona. La LH, GnRH y la hormona del crecimiento (GH) también inhiben la muerte de las células de la granulosa y en consecuencia actúan como factores de sobrevivencia folicular. La GH también participa en la regulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico potenciando la acción de las gonadotropinas (Kaipia y Hsueh, 1997; Oliver, 1999).

Otros factores que participan en la modulación del desarrollo del folículo son de origen intra ovárico, entre los que se encuentra el factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I) que interactúa con las gonadotropinas y estimula la diferenciación de las células de la granulosa, también inhibe la apoptosis en el folículo. Se ha mostrado que al mantener folículos preovulatorios de ratas en cultivo en ausencia de gonadotropinas se induce la fragmentación de ADN, pero al adicionar hCG o FSH al medio se inhibe la apoptosis de forma dependiente de la dosis. Un efecto inhibitorio similar se observó al adicionar IGF-I al medio de cultivo. Cuando se adicionan al medio la proteína unidora del IGF y hCG se observa que el efecto inhibitorio de la apoptosis de la hCG es menor que cuando se administra sola, por lo que los autores sugieren que el efecto antiapoptótico de las gonadotropinas es mediado en parte por el IGF-I (Chun y col., 1994).

El factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento fibroblástico básico (bFGF) también están implicados en el mantenimiento y la sobrevivencia del folículo. Cuando se mantienen folículos preovulatorios o células de la granulosa *in vitro*, y se le adiciona al medio EGF o bFGF se inhibe la fragmentación

de ADN en un 40-60%. Por lo que los autores sugieren que estos factores inhiben el proceso de apoptosis (Tilly y col., 1992).

Kaipia y Hsueh (1997) mostraron que al mantener folículos preovulatorios *in vitro*, en un modelo de inducción de apoptosis, y adicionar la interleucina-1 β (IL-1 β) se inhibe la apoptosis. Por otra parte, al adicionar un antagonista de los receptores de esta interleucina su efecto antiapoptótico fue suprimido, con base en lo antes mencionado este factor es considerado como inhibidor de la apoptosis en el ovario.

Los estrógenos también estimulan el crecimiento de los folículos como se ha mostrado en ratas hipofisectomizadas. Cuando se les administran estrógenos se incrementa la división de las células de la granulosa y disminuye la atresia de los folículos preantrales. También se ha mostrado que si a estas ratas además de los estrógenos se les administra FSH se estimula el crecimiento y diferenciación del folículo y la formación del antro (Payne, 1955). Lo anterior sugiere que los estrógenos son necesarios para el desarrollo de los folículos.

En el ovario los andrógenos, actúan como promotores de la atresia folicular. Billig y col. (1993) mostraron que en ratas de 22 días de edad hipofisectomizadas se induce la fragmentación de ADN, cuando a estos animales se les administra benzoato de estradiol se inhibe la apoptosis. Por el contrario, al administrar benzoato de estradiol y testosterona se observa que disminuye el peso de los ovarios y aumenta la fragmentación de ADN de forma dependiente del tiempo. El aumento en la fragmentación de ADN también se observó al mantener células de la granulosa en cultivo y adicionar testosterona al medio. También se ha mostrado que los folículos atrésicos se caracterizan por la disminución en la actividad de la enzima aromatasa, que resulta en la menor producción de estrógenos y la acumulación de andrógenos (Tilly, 1996; Kaipia y Hsueh, 1997). Con base en estas evidencias se sugiere que la testosterona es un factor inductor de la apoptosis.

Otros factores intraováricos inducen la atresia. El factor necrosis tumoral α (TNF α), cuyo receptor contiene un dominio de muerte celular que activa la enzima esfingomielinasa que degrada a la esfingomielina y estimula la formación de ceramida, la cual se ha mostrado que induce la apoptosis en cultivos de células foliculares. Otro factor que favorece la atresia del folículo es la interleucina-6, la cual induce la fragmentación del ADN (Kaipia y Hsueh, 1997).

El desarrollo folicular y la atresia en el ovario de mamífero son procesos que son regulados por factores promotores de la muerte o la sobrevivencia celular entre los que se incluyen hormonas como las gonadotropinas y factores intraováricos como los esteroides gonadales, citocinas y proteínas intracelulares. En estudios recientes se ha sugerido que la apoptosis de las células de la granulosa tiene un papel importante en el proceso de atresia folicular (Matsuda-Minehata y col., 2006).

APOPTOSIS

Se han descrito dos vías principales de muerte celular: un proceso pasivo que conduce a la necrosis y un programa activo, denominado apoptosis. La necrosis ocurre en respuesta a anomalías no fisiológicas en el ambiente celular, como pueden ser altas dosis de compuestos tóxicos, hipotermia, hipoxia o infecciones virales. Se caracteriza porque la célula se hincha, la membrana celular se rompe, el ADN se degrada, hay daño de los organelos citoplasmáticos, incluyendo la mitocondria, dilatación del retículo endoplásmico y formación de vacuolas. Como consecuencia del proceso necrótico se pierde la integridad de la membrana celular y se libera el contenido celular, lo que resulta en la inflamación del tejido circundante (Frago y col, 2001).

La apoptosis es un proceso de muerte celular que es activado por la aparición o desaparición de señales provenientes de otras células y se caracteriza por una

secuencia de cambios morfológicos y bioquímicos. Al final del proceso, la célula apoptótica o sus fragmentos son fagocitados por células vecinas o macrófagos. Es un proceso esencial que ocurre en todos los organismos multicelulares. Mientras millones de células proliferan y dan origen a nuevas unidades, millones de otras células están programadas para morir. Este proceso participa en la regulación del desarrollo de los organismos, y es el principal mecanismo que modula el número de células en cualquier tejido. Además, es un mecanismo de eliminación de células que podrían representar un riesgo para el organismo, por ejemplo células infectadas por virus y células tumorales (Peitsch y col., 1993).

El proceso de apoptosis se caracteriza por diferentes eventos morfológicos donde inicialmente se produce la fragmentación del ADN. Estos fragmentos de ADN al observarse en geles de agarosa, se aprecian en bandas en escalera. Posteriormente se produce la compactación de los organelos celulares y como consecuencia se incrementa la densidad de la célula, proceso durante el cual se encoge, el citosol se condensa y el citoesqueleto se colapsa. Un evento importante es la translocación de la fosfatidilserina, que es un fosfolípido de membrana, hacia el exterior de la membrana celular, lo que provoca que la célula moribunda sea fagocitada inmediatamente por sus vecinas o por los macrófagos (Alberts y col., 1999). Este proceso de apoptosis no produce una respuesta inflamatoria, como es en el caso de la necrosis (Wyllie, 1980).

Con base en los resultados de diversos estudios se ha sugerido que existe una relación entre la atresia de los folículos y el proceso de apoptosis. Tilly y col. (1991) mostraron que en los folículos atrésicos extraídos de ovarios de pollo o de cerdo adultos, el ADN de las células de la granulosa y de la teca interna se fragmenta y se observa el patrón de bandas en escalera. De la misma forma se analizó el ADN de folículos preovulatorios y post-ovulatorios y se encontró que la cantidad del ADN fragmentado era mayor en los folículos post-ovulatorios que en los preovulatorios. Estos resultados llevaron a los autores a postular que la atresia folicular es mediada

por la apoptosis y que en los folículos preovulatorios es menos frecuente el proceso de apoptosis que en los post-ovulatorios o en los folículos en desarrollo.

En estudios *in vivo* e *in vitro* se ha mostrado 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, posiblemente debido a la falta de las gonadotropinas. Se ha mostrado que cuando a ratas hipofisectomizadas se les administra FSH recombinante aumenta el peso del ovario y el número de folículos antrales, sin embargo el 50% de ellos son atrésicos. Cuando se administra la FSH y además hCG aumenta el número de folículos antrales sanos y disminuyen los atrésicos. Estas evidencias permiten pensar que el folículo requiere de las gonadotropinas para sobrevivir hasta convertirse en un folículo preovulatorio (Mannaerts y col., 1994). 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 modulan la producción de las gonadotropinas y la expresión de los receptores a la FSH en la gónada (Chun y col., 1996).

En los folículos preovulatorios las gonadotropinas inhiben el proceso de apoptosis, como se ha observado al mantenerlos *in vitro*, donde la adición de FSH o de hCG inhiben la fragmentación espontánea de ADN en un 60%. En este tipo de folículos continúan actuando las hormonas y los factores de crecimiento que regulan su supervivencia. Otro factor asociado al desarrollo de este tipo de folículos es la insulina, ya que cuando se mantiene *in vitro* folículos y se les adiciona insulina al medio disminuye la apoptosis en las células foliculares (Chun y col., 1994). Al parecer el efecto antiapoptótico que tienen los factores de crecimiento y las gonadotropinas en las células de la granulosa es mediado por la activación de segundos mensajeros (Tilly y col., 1992). Además de las gonadotropinas, la

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

Tilly y colaboradores (1992) mostraron que en los folículos atrésicos de cerda adulta disminuye el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifica para los receptores de membrana de las gonadotropinas y del citocromo P450, lo que se acompaña de la disminución de la concentración de los estrógenos en el fluido folicular. De todo lo anterior los autores concluyen que como resultado de la disminución en la concentración de las gonadotropinas y los estrógenos, en las células foliculares se activa una endonucleasa inductora de apoptosis que conduce al folículo a la atresia. Los resultados anteriores permiten apoyar la idea de que las gonadotropinas y los estrógenos se encuentran entre los factores que mantienen la salud del folículo ovárico.

En otros estudios han confirmado y ampliado la información obtenida por Tilly y col. (1992) acerca del proceso de apoptosis y atresia folicular. En folículos ováricos antrales de ratas prepúberes mantenidos en cultivo, se observó que la FSH inhibe la expresión del proceso de apoptosis en un 60% y los factores de crecimiento [factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I), interleucina-1 β (IL-1 β), EGF y bFGF], la activina, LH, y GH también inhiben este proceso, pero en menor proporción. Estos resultados apoyan la idea de que además de las gonadotropinas existen otros factores involucrados en la regulación de la apoptosis en el folículo (Chun y col, 1996).

La condensación de la cromatina es una de las características morfológicas de la apoptosis (Wyllie, 1980; Billig y col., 1993) y resulta de la activación de endonucleasas dependientes de calcio y magnesio (Kyprianov y col., 1998). Se han purificado y caracterizado varias endonucleasas involucradas en el proceso de apoptosis. En las células de la granulosa de los folículos ováricos de rata, existe actividad de la desoxiribonucleasa I (DNasa I), una endonucleasa que al parecer es la responsable de

que el ADN se fragmente en este organelo (Boone y col., 1995). Por estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado que la DNasa I se encuentra tanto en las células de la granulosa de los folículos sanos y atrésicos, como en los cuerpos lúteos (Boone y Tsang, 1997). Estos hechos permiten sugerir que la endonucleasa está presente pero en estado inactivo, y que se requiere una señal para activarla y como consecuencia se lleve a cabo la degradación del ADN durante la atresia folicular o la regresión luteal (Boone y Tsang, 1998).

Recientemente se ha mostrado que existe una familia de proteasas (caspasas), cuya activación representa los primeros eventos que conducen a la muerte celular programada (Yuan, 1997).

Las caspasas son efectores o ejecutores de la apoptosis de las células foliculares, que actúan sobre más de 40 proteínas celulares. Entre las caspasas más importantes se encuentra la caspasa activadora de la DNasa (CAD), que cuando se activa induce la fragmentación del ADN del núcleo. Además, las caspasas son responsables de la fragmentación del núcleo y de las proteínas del citoesqueleto, llevando a la formación de pequeñas vesículas (cuerpos apoptóticos) y la fragmentación de la célula (Cooper, 2000).

Las caspasas se encuentran en la célula en su forma inactiva (procaspasas) y son activadas por una reacción proteolítica, en la cual la procaspasa se fragmenta permitiendo que la caspasa activa quede libre y ejerza su acción. Esta proteólisis puede ser catalizada por otras caspasas. El factor activador de proteasa 1 (Apaf-1) se une a otras caspasas (caspasa 9 y caspasa 3) y promueve su activación. Mediante la activación inicial de las caspasas se inicia una serie de reacciones en cadena que culminan con la muerte de la célula (Figura 5).

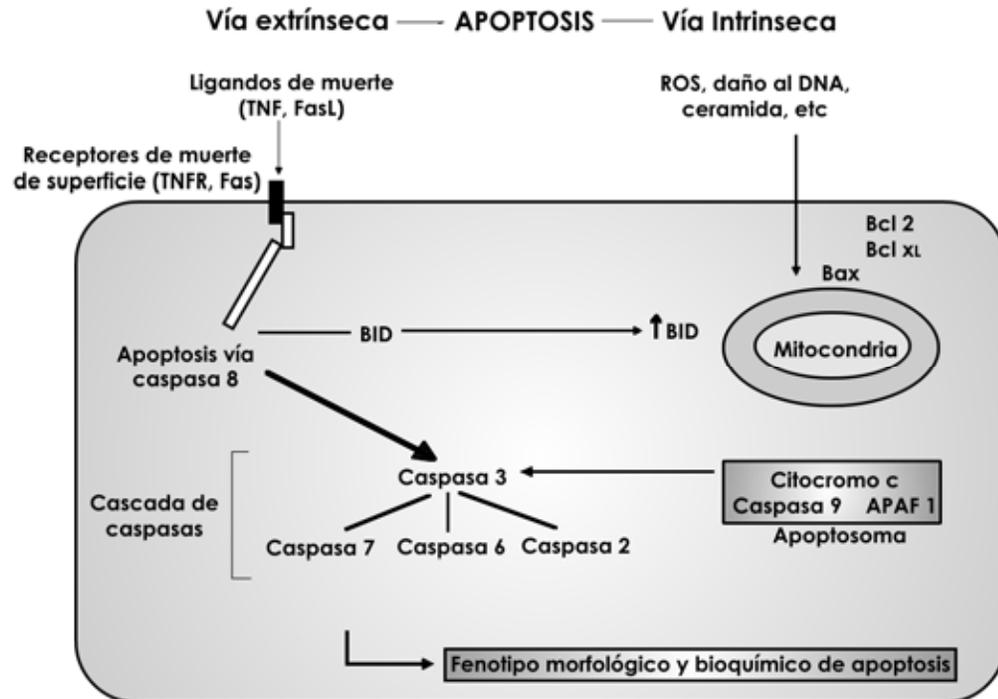


Figura 5. Esquema que resume las vías por las cuales puede activarse y llevarse a cabo la apoptosis de las células. Miembro proapoptótico de la familia Bcl-2 (BID); Factor tumor necrosis (TNF); Receptor al factor tumor necrosis (TNFR); Especies reactivas de oxígeno (ROS); Ligando Fas (FasL) (Modificado de: Barret y col., 2001).

Boone y Tsang (1998) mostraron en la rata la influencia de la caspasa-3 en el proceso de atresia folicular y la regresión luteal. En este estudio se mostró que si se activa la caspasa-3 se produce la activación de la endonucleasa que provoca la atresia del folículo y que la caspasa-3 está presente en las células de la granulosa apoptóticas, en células luteales y en células de la teca de los folículos sanos y atrésicos. Sin embargo no está presente en las células de la granulosa de los folículos sanos. Lo antes mencionado permitió pensar que la caspasa-3 actúa sobre las células de la granulosa provocando la apoptosis de las mismas. Sin embargo no se tiene idea clara de su influencia sobre las células de la teca, ya que estas células la contienen antes y después de llevarse a cabo la atresia del folículo.

En el proceso de apoptosis se encuentran involucradas las mitocondrias y en su superficie interactúan los miembros pro- y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2. Un

exceso de la actividad pro-apoptótica provoca la liberación del citocromo c, que al unirse al factor activador de la proteasa 1 (APAF-1) y a la pro-caspasa 9 forma el complejo apoptosoma. Este complejo activa la cascada de caspasas que estimulan diversos eventos, como la liberación de la caspasa activadora de la enzima DNasa (CAD), que provoca la fragmentación del ADN. En células de la granulosa de la coneja 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 (Markström y col., 2002; Maillet y col., 2002).

LA FAMILIA BCL-2

En los mamíferos existe una familia de proteínas llamada la familia Bcl-2, algunos de cuyos miembros funcionan como inhibidores de la activación de las caspasas y de la apoptosis (Antiapoptóticos: bcl-2, bcl-xL, bcl-w, Mcl 1, A1, NR-13, BHRF 1, DRF 16, entre otros), mientras que otros miembros de la familia Bcl-2 promueven la muerte de la célula (Proapoptóticos: bax, bcl-xS, bok y bak, entre otros) (Hsu y Hsueh, 2000).

Las proteínas de esta familia poseen por lo menos uno de los cuatro dominios homólogos a bcl-2 (BH1, BH2, BH3 y BH4). Los antiapoptóticos contienen al BH1 y BH2 por lo menos, aunque hay algunos que presentan los cuatro dominios. Por otra parte, los miembros proapoptóticos pueden ser divididos en dos grupos dependiendo del grado de homología estructural que compartan con bcl-2: un grupo que comparte los dominios BH1, BH2 y BH3, entre las que se encuentran bax, bak y bok, mientras que otro grupo tan sólo coincide estructuralmente con una pequeña región central, de 9 a 11 residuos, del dominio BH3, como son bik, blk, Hrk, BNIP 3, bad, bid y EGL-1 (Figura 6) (Hsu y Hsueh, 2000).

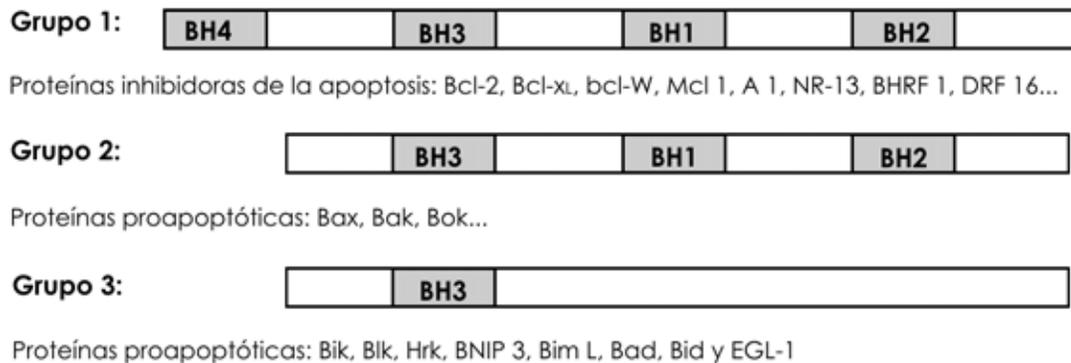


Figura 6. Esquema que muestra la estructura de los miembros de la familia Bcl-2. El primer grupo corresponde a las proteínas inhibidoras de la apoptosis, las cuales presentan el dominio BH4; El segundo grupo corresponde a proteínas proapoptóticas formadoras de canales, las cuales no presentan el dominio BH4; Al tercer grupo corresponden proteínas que forman ligandos proapoptóticos, las cuales únicamente presentan el dominio BH3 (Modificado de: Hsu y Hsueh, 2000).

En tejidos adultos normales de humano, la presencia de la bcl-2 parece estar restringida al compartimiento proliferativo, donde se localizan las células madre que se dividen y diferencian continuamente a elementos maduros. En células con una larga vida, como las neuronas, también se expresa bcl-2. Por otra parte, en células terminales diferenciadas de los epitelios de colon, piel y próstata, las cuales son eliminadas constantemente, la expresión de bcl-2 disminuye o esta ausente. Sin embargo, se debe señalar que en algunas células sensibles al estímulo hormonal como el endometrio o los folículos ováricos también hay una alta expresión de bcl-2. Con base en ello se sugiere que la bcl-2 es un factor necesario para la supervivencia de las células (Antonsson y Martinou, 2000).

SEROTONINA Y FUNCIONES DEL OVARIO

La GnRH secretada por el hipotálamo, así como también la activina y la inhibina, regula la secreción de la LH y la FSH. La secreción de las gonadotropinas también es modulada por las hormonas ovaricas. La GnRH es sintetizada en neuronas denominadas GnRHérgicas que se localizan en el área preóptica del

hipotálamo anterior y en el área medio basal y es liberada de forma pulsátil hacia los vasos portales hipotálamo-hipofisarios. Los estrógenos y los diferentes sistemas de neurotransmisión, entre los que se encuentran las catecolaminas, el ácido gama aminobutírico, el neuropéptido Y, los aminoácidos excitadores y la serotonina entre otros, participan en la modulación de la secreción de la GnRH y por ende de las gonadotropinas (Domínguez y col., 1991).

La serotonina es un neurotransmisor que se forma a partir de un aminoácido precursor, el triptófano, que proviene de los alimentos como la carne. Entre sus acciones esta la de modular la secreción de la GnRH, también actúa como vasoconstrictor y estimula la contracción de la pared intestinal. En el proceso de neurotransmisión la serotonina es liberada de una célula nerviosa a otra, dando lugar a la formación de un impulso nervioso, que puede traducirse en la estimulación o inhibición de una actividad celular. La serotonina, después de llevar a cabo su acción, pasa de nuevo del espacio sináptico a la neurona que la liberó, para ser reciclada y reutilizada en otra ocasión, o bien es procesada y convertida en una molécula inactiva (Frazer y Hensler, 1994).

En 1964, Dhalström y Fuxe, describen la existencia de 9 paquetes celulares, que se encuentran en los núcleos del rafé (dorsal, medial y del puente) que producen serotonina, a los que identificaron como B1-B9 (Frazer y Hensler, 1994). La inervación que se origina en los núcleos dorsal y medial envían sus proyecciones hacia diferentes regiones del encéfalo como el hipotálamo (Takeuchi, 1988). Por técnicas de inmunohistoquímica se ha mostrado que las fibras serotoninérgicas hacen sinapsis en la eminencia media con las terminales de las neuronas que liberan la GnRH, lo que ha permitido sugerir que este neurotransmisor participa en la regulación de la liberación de esta hormona (Jennes y col., 1982). La información existente acerca del efecto de la serotonina sobre la secreción de la GnRH es contradictoria. Se ha sugerido que las fibras serotoninérgicas que inervan al hipotálamo medio basal tienen un efecto

inhibitorio sobre la secreción de la GnRH, mientras que las que inervan al área preóptica estimulan la liberación de la GnRH (Montagne y Calas, 1988).

Los estudios en los que se analiza la participación de la serotonina en la modulación de la GnRH sugieren que en la rata hembra esta amina modula la secreción de la LH sin afectar la de FSH (Vitale y col., 1986; Montagne y Calas, 1988). Además de la diferente participación de la serotonina en la regulación de secreción de las gonadotropinas entre la hembra y el macho, se ha mostrado que la función de la amina en este proceso varía durante el desarrollo del animal. Arias y colaboradores (1990), mostraron que la serotonina tiene un efecto estimulante sobre la secreción de LH en ratas hembra de 16, 18 y 20 días de edad, mientras que a los 26 y 30 días este efecto no se observa, lo cual permite pensar que la serotonina tiene un efecto diferencial durante el desarrollo del animal.

En el lóbulo anterior y medio de la hipófisis existe inervación serotoninérgica que penetran a esta glándula junto con los vasos sanguíneos, lo cual podría indicar que la serotonina tiene un papel en el control vasomotor y regula el flujo sanguíneo hacia la hipófisis. Así mismo se ha mostrado que la serotonina actúa directamente en la hipófisis en donde estimula la liberación de la prolactina (Westlund y Childs, 1982). Johns y colaboradores (1982) observaron que en el lóbulo anterior de la hipófisis la serotonina es recapturada por las terminales serotoninérgicas y también es almacenada en los gonadotropos. Estas evidencias permiten pensar que la serotonina posiblemente participa directamente en la hipófisis regulando la liberación de las gonadotropinas y el flujo sanguíneo que recibe este órgano.

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 en los mastocitos y las plaquetas (Sirotkin y Schaeffer, 1997). Según Veselá y col. (2003), la serotonina es sintetizada por el ovario, oviducto y útero de la rata, sin embargo en el

ovario no se han realizado estudios que demuestren la presencia de las enzimas triptofano hidroxilasa o la triptamina descarboxilasa, las cuales son indispensables para la síntesis de la serotonina. Al parecer esta amina participa en la regulación de la esteroidogénesis por la gónada y como consecuencia, posiblemente está implicada en la regulación de la maduración folicular. En el ovario de criceto (hamster) 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 el pico en la concentración de GnRH que es acompañado por la degranulación de los mastocitos y liberación de la histamina almacenada en ellos, y se sugiere que este evento se asocia al incremento en la concentración de progesterona y testosterona en el suero que podrían ser responsables de la degranulación de los mastocitos (Battista y Condon, 1986; Krishna y Terranova, 1985), posiblemente durante este evento también es liberada la serotonina que se encontraba almacenada en los mastocitos.

En la rata prepúber de 24 días de edad el tratamiento con serotonina bloquea la ovulación inducida por la administración de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG), y 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 gonadotropina coriónica humana (hCG) el número de ovocitos liberados es menor y la edad de la apertura vaginal se retrasa en comparación con el grupo de animales testigo. El bloqueo de la ovulación se acompaña de la disminución del peso de los ovarios. Estas observaciones llevaron al autor a pensar que la serotonina tiene un efecto inhibitorio sobre la ovulación, aunque el sitio y mecanismo de acción aún no se conocen con exactitud pero es posible que la serotonina module de manera inhibitoria la respuesta del ovario a la acción de las gonadotropinas (O'Steen, 1965). En la rata adulta la concentración de serotonina en el 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 participa en la regulación de la ovulación (Clausell y Soliman, 1978).

Cuando los ovarios del criceto se mantienen en cultivo y se adiciona serotonina al medio se 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 llevó a los autores a pensar que la serotonina posiblemente participa en el proceso de ovulación al actuar directamente en el ovario, aunque esto no se ha demostrado en estudios *in vivo* (Talbot y Schroeder, 1982).

Schmidt y col. (1988) mostraron que cuando a los ovarios de ratas son mantenidos en un sistema de perfusión y se adiciona serotonina o LH al sistema se induce la ovulación, observando el mayor efecto con la administración de la LH. Por el contrario, cuando se adicionan 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, el número de ovocitos liberados es menor. Con base en estas observaciones, los autores sugieren que la serotonina modula el proceso de ovulación, posiblemente al actuar localmente en el proceso de inflamación que precede a la ruptura del folículo.

Cuando se inyecta serotonina directamente en el hipotálamo de ratas de 16 días, se bloquea la liberación de la LH. En cambio, cuando son tratadas con el 8-hidroxi-(2-N,N-dipropilamino)-tetralina (agonista de los receptores a serotonina 5-HT₁) se estimula la síntesis de la FSH y la LH. Estas evidencias apoyan la idea de que la serotonina regula la ovulación inhibiendo o estimulando la secreción de las gonadotropinas y en particular de la LH, y su efecto depende del receptor sobre el cual actúe (Kordon, 1969).

Estudios previos han mostrado que cuando ratas de 30 días de edad son tratadas en forma prolongada 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 llevaron a los autores a pensar que la serotonina modula de manera inhibitoria la respuesta del ovario a la FSH y LH y como consecuencia el crecimiento y la maduración del folículo ovárico que culmina con la primera ovulación (Morán y col., 2001).

Así mismo, a la serotonina se le atribuye un papel estimulante en la regulación de la esteroidogénesis. En un estudio realizado con ratas adultas en proestro a las que se les administró ketanserina se observó que la concentración sérica de estradiol disminuyó inmediatamente después de la administración del fármaco. Cuando folículos preovulatorios de rata se mantienen en cultivo y se les adiciona ketanserina, se inhibe la producción de progesterona, testosterona y estradiol. Estos experimentos permitieron sugerir a los autores que la serotonina estimula la esteroidogénesis en los folículos preovulatorios de la rata vía el receptor 5-HT₂ (Tanaka y col., 1993). Battista y Condon (1986) también observaron que en el cuerpo lúteo de vaca mantenido *in vitro*, la administración de serotonina estimula la producción de progesterona.

La participación de la serotonina en la regulación de la esteroidogénesis también se ha observado en células de la granulosa de folículos mantenidos *in vitro*, ya que al adicionar serotonina al medio de cultivo, en concentración de 10⁻⁴, 10⁻⁵, 10⁻⁶ ó 10⁻⁷, se estimula la síntesis de progesterona de forma dosis dependiente, mientras que la concentración de estradiol también se incrementa aunque de forma independiente a la dosis. El efecto estimulante de la serotonina es bloqueado por la adición de propanolol (un antagonista de los receptores β-adrenérgicos), lo cual permite sugerir que la serotonina podría estar actuando sobre un receptor del tipo β de la membrana de las células de la granulosa (Bódis y col., 1992).

Resultados previos obtenidos en el laboratorio muestran que si se administra sulfato de serotonina a ratas de 30 días diariamente hasta el día 37 de edad se incrementa la producción de testosterona y disminuye la de progesterona. De igual forma se observó que estas modificaciones se acompañan del aumento en la incidencia de apoptosis en las células de la granulosa y como consecuencia de la atresia folicular. Sin embargo, no se observaron diferencias en la concentración de serotonina o su metabolito en el hipotálamo. Estos resultados nos permiten sugerir que es posible que el aumento en la incidencia de apoptosis sea el resultado de las modificaciones en la concentración de las hormonas esteroides como resultado de la acción de la serotonina directamente en el ovario (Gallegos, 2003).

En otros estudios se ha mostrado que la serotonina también se encuentra involucrada en la regulación del proceso de apoptosis en otros tejidos, como son en el pulmón, riñón, las células endoteliales, los mastocitos, las neuronas y los astrocitos. En el sistema nervioso la administración de un agonista de los receptores a serotonina 5-HT₁ previene la apoptosis de las células nerviosas, por lo que se considera que en este tipo de células la estimulación del receptor 5-HT₁ tiene un efecto protector. Por otra parte, también se ha observado que al administrar un antagonista del receptor 5-HT₂ se impide que las neuronas mueran por apoptosis, por lo que se sugiere que la estimulación de este receptor tiene un efecto inductor de la apoptosis en el sistema nervioso (Azmitia, 2001).

Estas evidencias permiten pensar que la serotonina esta involucrada en la regulación del proceso apoptótico en diversos tipos celulares. Sin embargo, se ha observado que en las células del músculo liso de la arteria pulmonar la serotonina estimula la proliferación de las células potenciando el efecto mitogénico de algunos factores de crecimiento. Al parecer el efecto de la serotonina en el proceso de apoptosis varía dependiendo del tejido sobre el cual actúa, ya sea inhibiendo o estimulando este proceso. Con base en la información de que disponemos la acción

de esta amina sobre las células de la granulosa y de la teca del folículo ovárico no ha sido estudiada por lo que es posible que en el ovario la serotonina sea un factor inductor de la apoptosis en las células foliculares.

JUSTIFICACIÓN

El crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico dependen de varios factores entre los que se encuentran las gonadotropinas, las hormonas esteroides y varios factores de crecimiento, sin embargo, no todos los folículos llegan a madurar y una gran parte de ellos degeneran por un proceso denominado atresia folicular, que es el resultado de la apoptosis de células de la granulosa y de la teca de los folículos. Se ha observado que cuando se administra serotonina por vía sistémica a la rata durante la etapa prepuberal hay un aumento en la incidencia de apoptosis en las células de la granulosa, misma que es acompañada por el aumento del número de folículos atrésicos en el ovario.

Lo anterior permite suponer que la serotonina administrada por vía sistémica actúa directamente en la eminencia media, inhibiendo la liberación de las gonadotropinas, o directamente en el ovario donde modifica la respuesta del órgano a las mismas, o en ambos lugares, lo que resulta en modificaciones en la síntesis de hormonas esteroides y el aumento de apoptosis en las células de la granulosa y en la incidencia de atresia folicular.

Además, el proceso de apoptosis es regulado por diversos factores de crecimiento y hormonas, así como también por proteínas como las caspasas y las proteínas sintetizadas a partir de una familia de genes conocida como Bcl-2 que se expresan en estas células, por lo que la modificación en la expresión de estos resulta en el aumento en la incidencia de apoptosis.

Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de serotonina por vía sistémica o directamente en la bursa del ovario sobre la síntesis de hormonas esteroides, atresia folicular, expresión de genes (bcl-2 y bax) que codifican para la síntesis de proteínas involucradas en el proceso de apoptosis, y la actividad de proteasas involucradas en la activación del proceso apoptótico (caspasa 3).

HIPÓTESIS

Si la serotonina inhibe la respuesta del ovario a la acción de las gonadotropinas, entonces la administración de serotonina resultará en el aumento en la síntesis de testosterona (proapoptótico) y disminución en la síntesis de estradiol y progesterona (antiapoptóticas) y, como consecuencia, aumentará el proceso de apoptosis y la atresia folicular.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar la participación del sistema serotoninérgico en la regulación del proceso de esteroidogénesis, apoptosis y atresia folicular en los ovarios de la rata prepúber, administrando sulfato de serotonina por vía sistémica o directamente en la bursa del ovario.

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar los efectos de la administración de sulfato de serotonina a ratas de 30 días de edad en la concentración de LH, FSH, progesterona, testosterona y 17β -estradiol en el suero.
- Evaluar el efecto de la administración de sulfato de serotonina a ratas de 30 días de edad sobre la expresión de los genes bcl-2 y bax, y la actividad de la caspasa 3 en el ovario de la rata.
- Evaluar la incidencia de atresia folicular y apoptosis en el ovario de la rata de 30 días de edad a la que se le estimula el sistema serotoninérgico durante el desarrollo prepuberal.

MATERIALES Y MÉTODO

ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se emplearon ratas hembra de 30 días de la cepa CIIZ-V (bioterio FES-Zaragoza, México, DF) mantenidas en condiciones controladas de iluminación, 14 hrs. luz y 10 hrs. oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h). En el día 21 de edad se retiró a la madre (destete) y las crías tuvieron libre acceso al agua y al alimento hasta el momento del sacrificio.

1.- Administración de 5-hidroxitriptamina (5-HT) por vía sistémica durante la etapa peripuberal.

Con el fin de analizar si el sistema serotoninérgico participa en la regulación de las funciones del ovario de la rata durante la etapa prepuberal, se evaluaron los efectos de la estimulación del sistema serotoninérgico mediante la administración de sulfato de serotonina sobre el proceso de esteroidogénesis, apoptosis y atresia folicular.

Para ello animales de 30 días de edad se inyectaron diariamente con 37.5 mg/Kg de peso corporal de sulfato de serotonina (Sigma Chemical, St Louis, USA) por vía sub-cutánea. Como grupo de comparación se utilizaron animales tratados con solución salina (0.9%). Grupos de animales se sacrificaron a las 6, 12, 18, 24, 36, 48, 120 ó 168 horas después de iniciar el tratamiento. Otros grupos de animales sin ningún tratamiento se sacrificaron a las edades antes mencionadas.

2.- Administración de 5-hidroxitriptamina (5-HT) en la bursa del ovario de la rata durante la etapa prepuberal.

Debido a que se ha propuesto que la serotonina modifica las funciones del ovario al actuar directamente en la gónada, se analizaron los efectos de la administración de serotonina dentro de la bursa del ovario.

Ratas hembra de 30 días se anestesiaron con éter entre las 9:00 y las 11:00 hrs. Se colocaron en posición dorsal y se les realizó una incisión que abarcó piel y músculo, se exteriorizó el ovario izquierdo y el derecho, se inyectó el sulfato de serotonina en una dosis de $1\text{mg} \times 40\mu\text{l}^{-1}$ /ovario o solución salina al 0.9%, en la bursa de los dos ovarios (Figura 7). Los ovarios se devolvieron a la cavidad abdominal y se suturó músculo y piel. Como grupo de comparación se utilizaron animales a los que se les anestesió con éter, se realizó una incisión que abarcó músculo y piel y se suturó, este grupo se denominó grupo con operación simulada. Otros animales fueron anestesiados con éter o no recibieron ningún tratamiento. Los animales fueron sacrificados a las 6, 12, 24 ó 48 horas después de la operación.

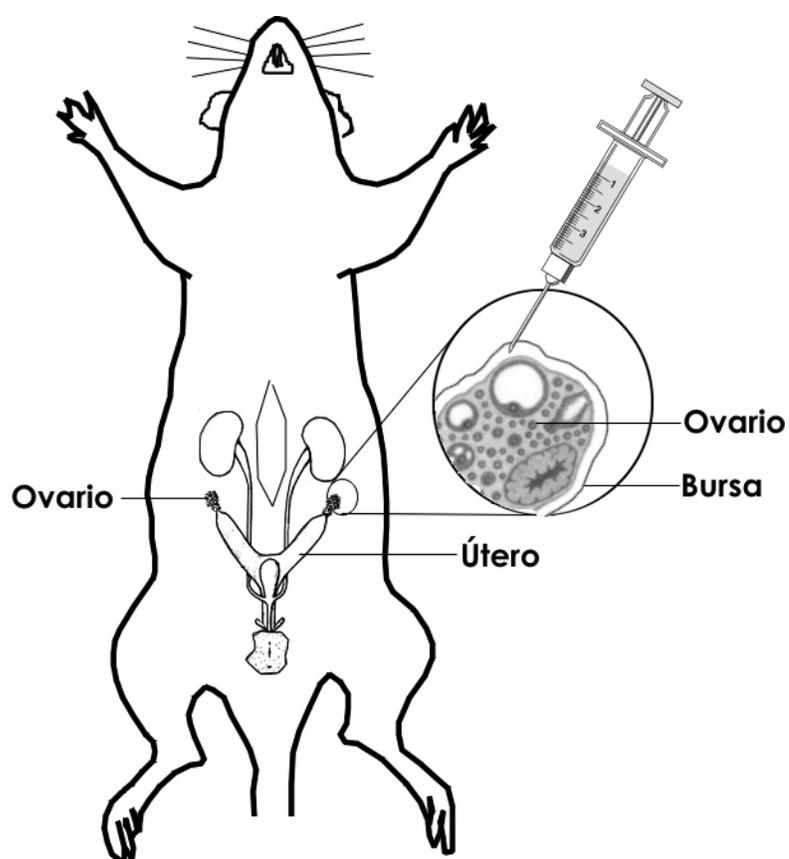


Figura 7. Esquema en el que se muestra la localización de los ovarios y la forma de administración de la solución salina o sulfato de serotonina en la cavidad de la bursa en el ovario de la rata.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Todos los animales fueron sacrificados por decapitación. A la autopsia se extrajeron los ovarios y se almacenaron en tubos estériles a -70°C para la evaluación posterior de la expresión de los genes *bcl-2* y *bax*, así como la actividad de la caspasa 3. Los ovarios de otros animales se fijaron en líquido de bouin o en paraformaldehído, posteriormente se incluyeron en parafina, se realizaron cortes histológicos y se evaluó la incidencia de atresia mediante la tinción de hematoxilina-eosina y la apoptosis por la técnica de TUNEL. En el día de la autopsia se colectó la sangre del tronco y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 min., se separó el suero, el que se colectó y almacenó a -20°C para la posterior cuantificación de testosterona, progesterona, 17β -estradiol, FSH y LH en suero por radioinmunoanálisis.

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS

En el suero se realizó la cuantificación de gonadotropinas (FSH y LH) y hormonas esteroides (progesterona, testosterona y 17β -estradiol) por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

Esteroides

La cuantificación de hormonas esteroides se realizó mediante RIA de fase sólida, para lo cual se empleó un estuche Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, USA). La concentración de progesterona se expresó en nanogramos por mililitro (ng/ml), mientras que la de testosterona y estradiol se expresó en picogramos por mililitro (pg/ml).

Para la cuantificación de progesterona y estradiol se tomaron 100 μl del suero y 1000 μl de la hormona marcada, los cuales se depositaron en tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos obtenidos en conejo. Todos los tubos se agitaron y se incubaron durante tres horas a temperatura ambiente. Se decantó el sobrenadante y se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en contador de centelleo para

realizar la cuantificación. La cuantificación de testosterona se realizó mediante el mismo procedimiento, tomando únicamente 50 µl de suero.

Gonadotropinas

La cuantificación de gonadotropinas se realizó mediante RIA de doble anticuerpo. Se emplearon los anticuerpos NIAMDD-Rat-LH-RP3 y NIAMDD-Rat-FSH-RP2 para LH y FSH respectivamente, proporcionados por la National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). La concentración de las dos hormonas se expresó en ng/ml.

Se tomaron 100 µl de suero por separado para cada hormona, a los cuales se les adicionaron 100 µl del anticuerpo respectivo (rLH-RP3 o rFSH-RP2) y se incubaron durante 24 hrs. a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se agregaron 100 µl del segundo anticuerpo y se incubaron durante 2 horas. Posteriormente se centrifugaron a -4°C a 3000 r.p.m. por 30 minutos. Se decanto el sobrenadante y se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en contador de centelleo para realizar el conteo.

MEDICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES BCL-2 Y BAX

En los ovarios almacenados a -70°C se realizó la extracción del ARN total mediante la técnica del TRIZOL (Apéndice A). Del ARN total se realizaron las RT-PCR, para lo cual se utilizó un estuche comercial (SuperScript™ First-Strand Síntesis System for RT-PCR, Invitrogen, California, USA). La transcripción reversa para obtener los cDNA, se realizó con oligo dT(deoxitimidina) y la enzima transcriptasa reversa (Super Script™ II). Una vez que se obtuvieron los cDNA se cuantificaron y se realizaron los PCR para amplificar las secuencias de bax y bcl-2, con la enzima Taq DNA polimerasa (Invitrogen, California, USA). Se realizaron 30 ciclos de amplificación. Los productos obtenidos del PCR fueron separados en un gel de agarosa al 1.2% y se revelaron con bromuro de etidio. Se tomo una fotografía del gel,

en la cual se realizó el análisis densitométrico de las bandas utilizando el programa Kodak 1D v. 3.6.

Cyc up: CCC CAC CGT GTT CTT CGA CAT

Cyc low: GCT GGT CTT GCC ATT CCT GGA

Bcl-2 up: CGG CTT TGC AGA GAT GTC CA

Bcl-2 low: ATG CCG GTT CAG GTA CTC AG

Bax up: CTG AGC TGA CCT TGG AGC

Bax low: GAC TCC AGC CAC AAA GAT G

Temperatura de alineamiento: 57°C

ANÁLISIS DE LA ACTIVIDAD DE LA CASAPASA 3

En los ovarios que se almacenaron a -70°C se analizó la actividad de la caspasa 3 mediante un estuche de inmunoensayo (Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric; Sigma Chemical, St Louis, USA). Para ello, los ovarios se homogenizaron en un politron con un buffer de lisis. Al lisado de ovarios se le adicionó acetyl-Asp-Glu-Val-Asp p-nitroanilida (Ac-DEVD-pNA), sustrato que es hidrolizado por la caspasa 3, permitiendo que se libere p-nitroanilida (pNA), la cual es una molécula cromófora que permitió evaluar en un espectrofotómetro la actividad de la caspasa 3. La lectura en el espectrofotómetro se realizó a 405 nm (Apéndice B).

EVALUACION DE LA APOPTOSIS MEDIANTE LA TÉCNICA DE TUNEL

En los ovarios fijados en paraformaldehído e incluidos en parafina se realizaron cortes seriados de 7 µm, se colectaron tres cortes después de una serie de diez y se procesaron siguiendo la técnica de TUNEL, para lo cual se utilizó un estuche comercial (Boehringer Mannheim Corp., Indianápolis, IN, USA). Las células apoptóticas se identificaron por la marca color café. Mediante el uso de un ocular micrométrico se hizo el análisis morfométrico de todos los folículos en los que realizo

la evaluación del número de células apoptóticas, para lo cual se midió el diámetro mayor y el perpendicular al primero. El diámetro promedio se calculó mediante la siguiente relación:

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

Con base en el diámetro promedio los folículos se clasificaron en clase 1, 2 y 3 de acuerdo a los siguientes rangos (Hirshfield y Midgley, 1978):

Clase 1 < 275µm

Clase 2 275-450µm

Clase 3 > 400µm

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

1. Moderada: Presentaban 2-10 células con marca en las primeras capas de células de la granulosa alrededor del antro folicular.
2. Intensa: Presentaban 11-20 células de la granulosa con marca y presencia o no de cuerpos apoptóticos.
3. Muy intensa: Folículos con mas de 20 células de la granulosa con marca y presencia de cuerpos apoptóticos.

EVALUACIÓN DE LA ATRESIA

En otro grupo de ovarios incluidos en parafina se realizaron cortes seriados de 10 µm que se tiñeron con hematoxilina-eosina para evaluar el estado del folículo (sano o atrésico). Se realizó el análisis morfométrico de todos los folículos que presentaron núcleo y nucleolo bien definido. Un folículo se consideró atrésico cuando se identificaron algunas de las siguientes características: alteración en la morfología del ovocito, engrosamiento de la capa de células de la teca, la presencia de células picnóticas y descamación de células de la granulosa en el antro folicular (Ryan, 1981).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados de la concentración de las hormonas esteroides y las gonadotropinas, la expresión de genes y la actividad de la caspasa-3 fueron analizados por una ANOVA seguida de la prueba de Tukey al ser comparados los diferentes grupos, y se utilizó la prueba de “t” de Student cuando se realizó la comparación entre dos grupos. El número de folículos fue analizado por la prueba “U” de Mann-Whitney, mientras que el porcentaje de folículos atrésicos fue evaluado por una prueba de Ji-cuadrada. Los datos representados en los cuadros y en las figuras se expresan en Media \pm error estándar de la media. En todas las pruebas se consideraron como diferencias significativas aquellas en las que la probabilidad fue igual o menor al 5%.

RESULTADOS

1. Efecto de la administración de serotonina por vía sistémica durante la etapa prepuberal

En los animales que fueron inyectados con solución salina no se observaron diferencias significativas en ninguno de los parámetros evaluados en comparación con el grupo de animales testigo absoluto, por lo que la evaluación de los efectos de la administración de sulfato de serotonina se realizó comparando con el grupo testigo absoluto.

Concentración de esteroides y gonadotropinas en suero

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en los animales tratados con sulfato de serotonina y sacrificados 120 horas después del tratamiento la concentración de progesterona fue menor, la concentración de testosterona no se modificó en ninguno de los tiempos estudiados, mientras que la concentración en suero de 17β -estradiol fue menor en los animales tratados con serotonina desde las 18 hasta las 168 horas pos-tratamiento excepto a las 36 horas donde no se observaron diferencias significativas (Figura 8).

La concentración de FSH en el suero de los animales que se inyectaron con sulfato de serotonina fue mayor a las 12, 24, 48 y 120 horas y fue menor a las 18 horas en comparación con el grupo testigo absoluto. La concentración de la LH disminuyó en los animales sacrificados a las 24, 48, 120 y 168 horas (Figura 9).

Expresión de bcl-2 y bax

En la figura 10 se muestran los resultados de la expresión de bcl-2 y bax. En comparación con el grupo testigo absoluto la expresión de bcl-2 fue mayor en los animales tratados con sulfato de serotonina y sacrificados a las 24 y 48 horas después

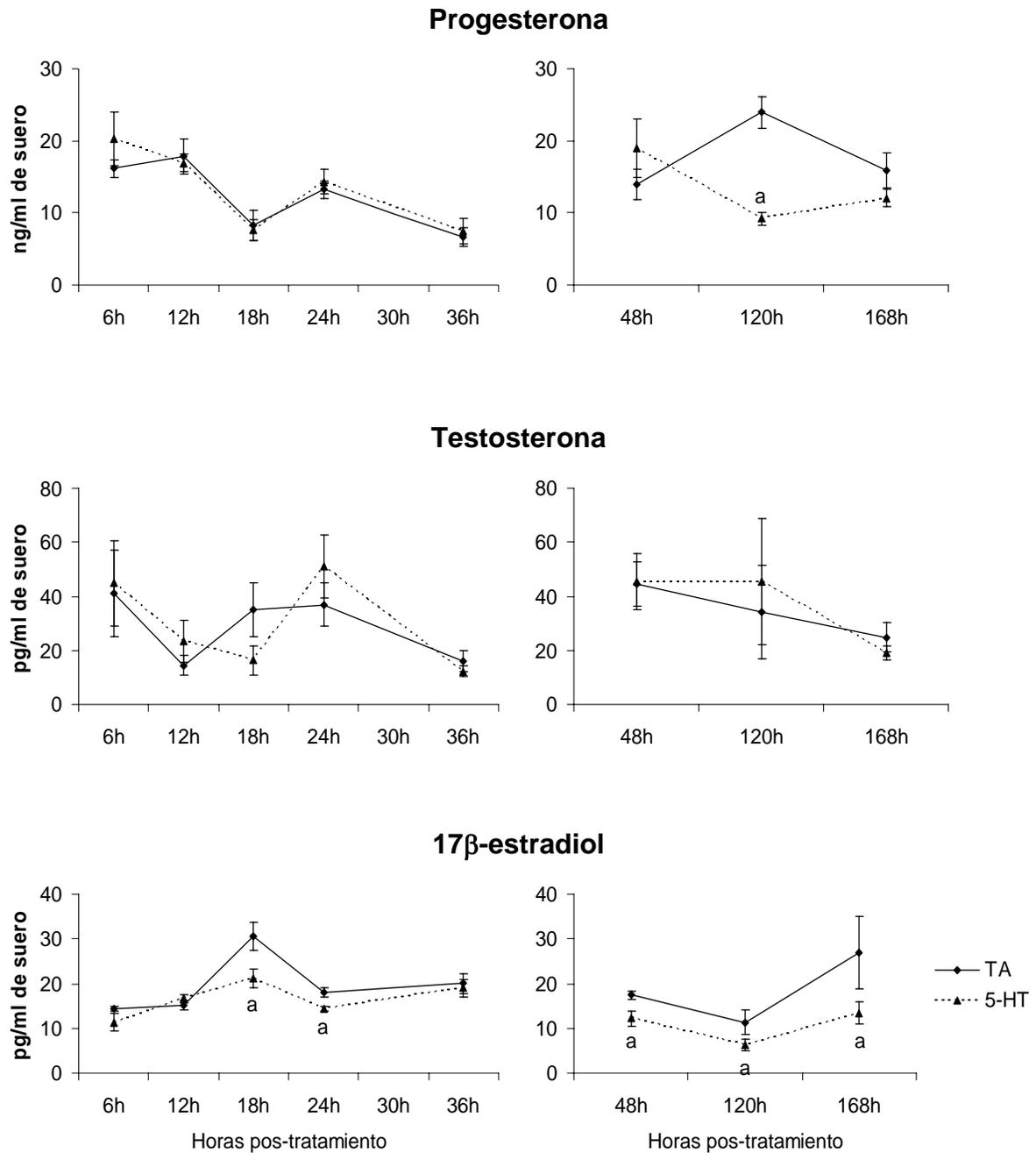
de iniciado el tratamiento. En cambio, la expresión de bax únicamente fue mayor en los animales tratados con sulfato de serotonina y que se sacrificaron a las 24 horas después de iniciar el tratamiento.

La actividad de la caspasa 3 fue mayor en los animales tratados con sulfato de serotonina y sacrificados a las 24 horas después de haber iniciado el tratamiento. No se observan modificaciones en la actividad de esta caspasa en el resto de las edades estudiadas (Figura 11).

Evaluación de la apoptosis mediante la técnica de TUNEL

En los ovarios de ratas testigo absoluto y tratadas con sulfato de serotonina se observaron folículos en las diferentes etapas de desarrollo. En la figura 12 se presentan fotomicrografías de folículos de clase 1 sanos (A, C y E), en donde se identifica el ovocito, células de la granulosa y de la teca sanas, también se observan folículos de clase 1 atrésicos, que se caracterizan por el desprendimiento de células de la granulosa, formación de cuerpos apoptóticos y células positivas a TUNEL, lo cual indica que en estas células se llevó a cabo la fragmentación de ADN, evento que ocurre en las etapas finales de la apoptosis (B, D y F).

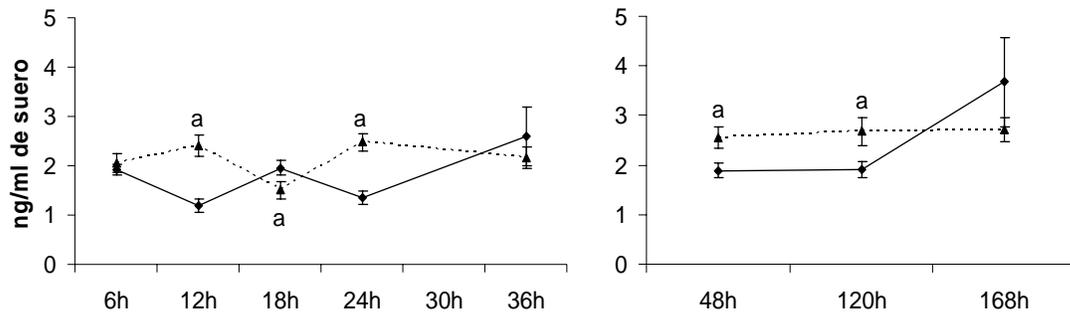
En la figura 13 se observan folículos de clase 2 sanos y atrésicos. Los folículos sanos (A, C y E) presentan cavidad antral, el ovocito de forma ovoide y una capa de células de la teca más gruesa que en los folículos de clase 1. En los folículos atrésicos (B, D y F) además de la descamación de células también se observa alteración en la forma del ovocito.



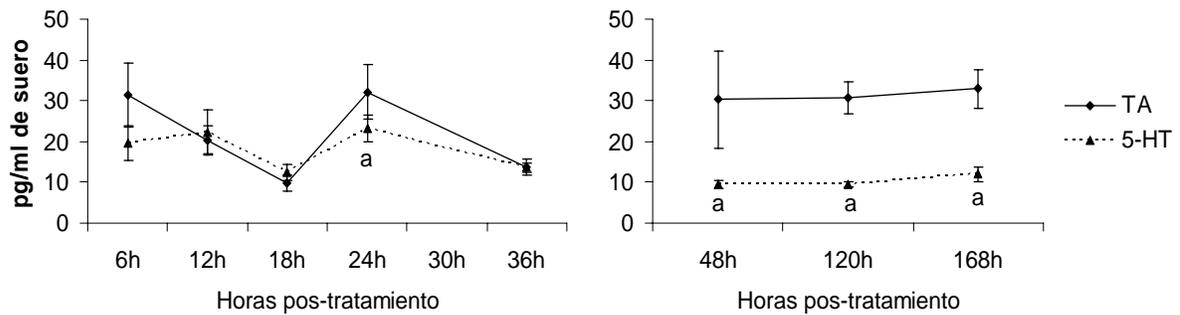
a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student).

Figura 8. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento.

FSH

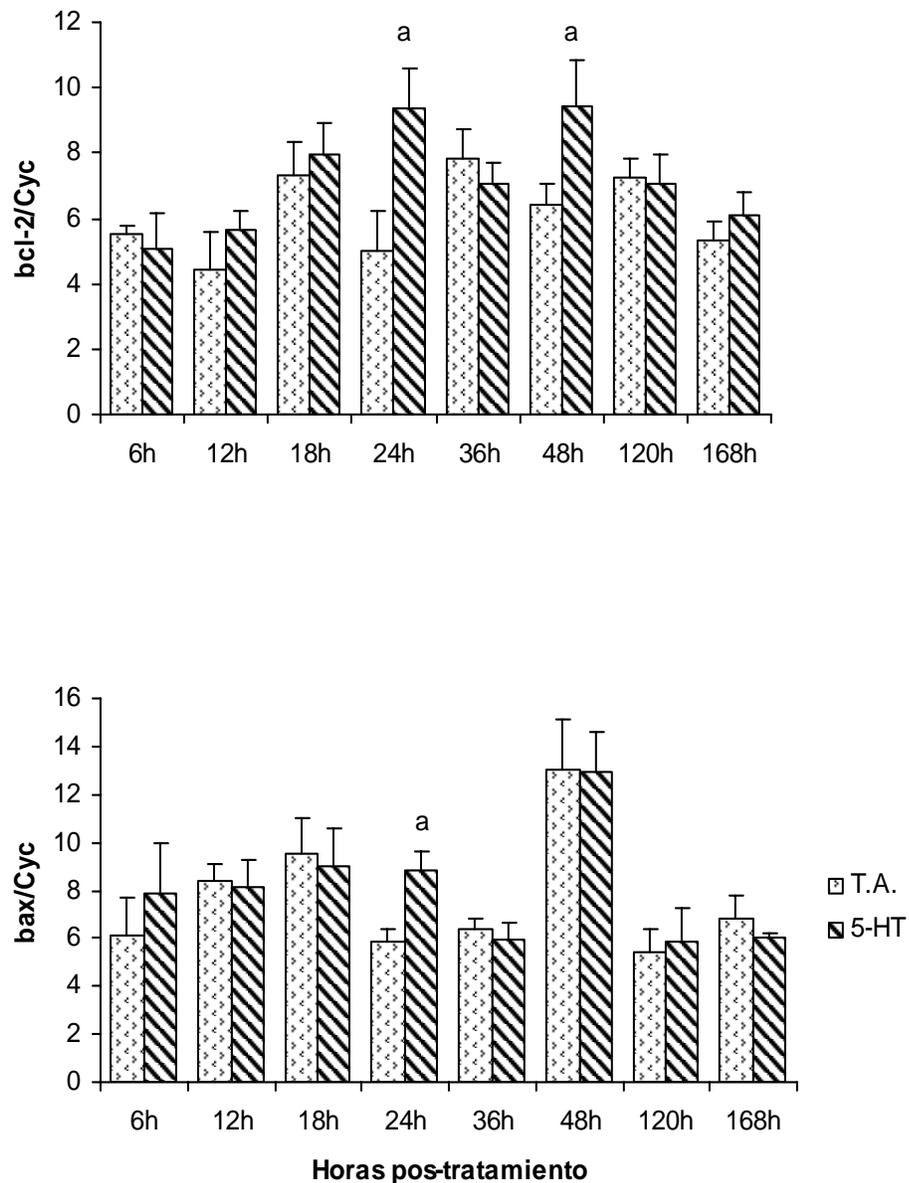


LH



a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student).

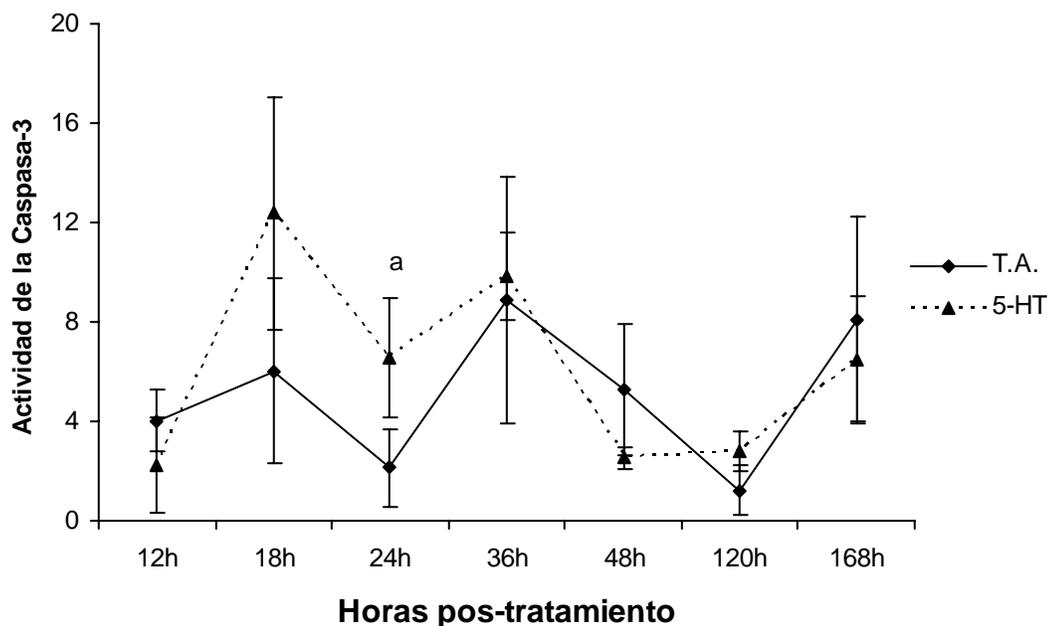
Figura 9. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de FSH y LH de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento.



a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student).

Figura 10. Media \pm e.e.m. de la expresión del ARNm de Bcl-2 y Bax en ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento.

En los folículos de clase 3 sanos (Figura 14) la cavidad antral es de mayor tamaño y están conformados por un mayor número de capas de células de la granulosa. En este tipo de folículos que son atrésicos se observan células positivas a TUNEL y descamación de células hacia el antro folicular (B, D y F).



a, $p < 0.05$ vs. TA (prueba "t" de Student).

Figura 11. Media \pm e.e.m. de la actividad de la caspasa-3 en ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento.

En los ovarios de los animales que se inyectaron con sulfato de serotonina la proporción de folículos clase 1 ($< 275 \mu\text{m}$) y clase 2 ($275-450 \mu\text{m}$) fue similar a la del grupo testigo absoluto, mientras que la proporción de folículos clase 3 ($> 450 \mu\text{m}$) fue mayor en los animales inyectados con sulfato de serotonina y sacrificados a las 6 horas después (Figura 15).

Cuando se realizó la evaluación de apoptosis mediante la técnica de TUNEL se observó que la proporción de folículos de clase 1 y 2 que presentaron células de apoptóticas fue menor en los animales tratados con sulfato de serotonina y sacrificados 6 horas después. La proporción de folículos clase 1 que presentaron células en apoptosis fue mayor en los animales sacrificados a las 24, 48, 120 y 168 horas después de iniciar el tratamiento. En los folículos de la clase 2 este aumento se observó únicamente a las 120 horas, mientras que en los folículos de clase 3 la

incidencia de apoptosis fue mayor en los animales sacrificados a las 120 y 168 horas después de iniciar el tratamiento (Figura 15).

En la figura 16 se muestran los resultados de la evaluación de folículos totales en función del tipo de marca que presentaban (moderada, intensa o muy intensa). Se observa que en los animales que fueron tratados con sulfato de serotonina la proporción de folículos con marca moderada e intensa fue mayor a las 48, 120 ó 168h después de iniciar el tratamiento en comparación con el grupo de animales testigo absoluto, mientras que fue menor en los animales sacrificados a las 6 horas después de iniciar el tratamiento. La proporción de folículos que presentaron marca muy intensa no se modificó en ninguna de las edades estudiadas.

Análisis morfométrico

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en los ovarios de los animales que recibieron sulfato de serotonina el número total de folículos medidos fue menor cuando los animales se sacrificaron a las 120 horas post-tratamiento y no se observaron cambios a las 48 y 120 horas. La proporción de folículos totales que presentaban características de atresia fue mayor en los animales inyectados con sulfato de serotonina y sacrificados a las 168 horas después de iniciar el tratamiento (Figura 17).

Cuando se analizó la población folicular en función del diámetro, en los ovarios de los animales que fueron inyectadas con sulfato de serotonina la proporción de folículos clase 1 y clase 2 no se modificó en ninguna de las edades estudiadas, mientras que la de folículos clase 3 fue menor cuando los animales se sacrificaron a las 48 ó 120h. Cuando se analizó el estado de los folículos se observó que en los animales sacrificados a las 168 horas la incidencia de atresia fue mayor en los folículos de clase 1 y 2 (Figura 18).

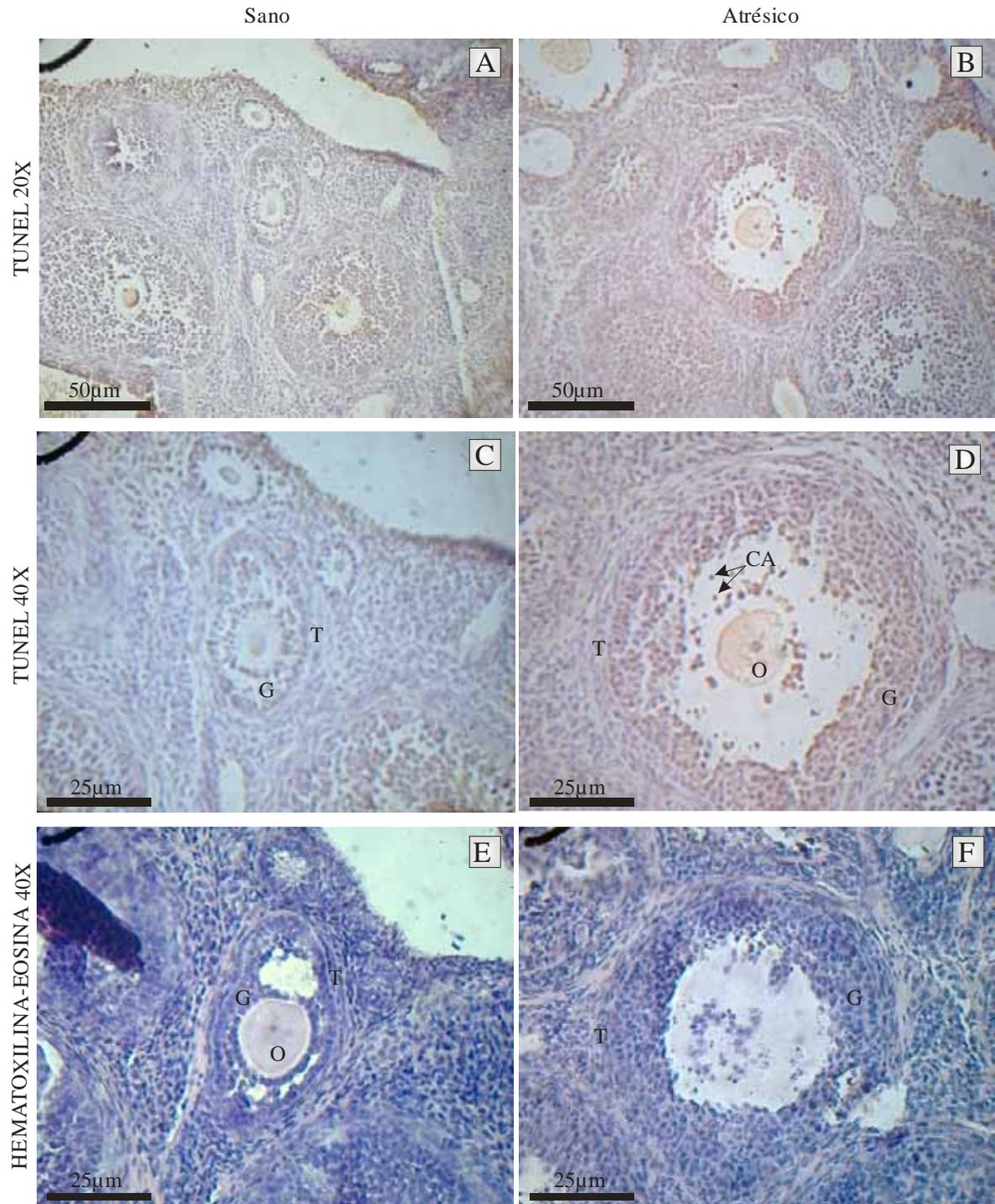


Figura 16. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) teñidos mediante la técnica de TUNEL (A, B, C y D) o Hematoxilina-Eosina (E y F) donde se observan folículos de clase 1 sanos (A, C y E) y atrésicos (B, D y F). Se observa el ovocito (O), las células de la granulosa (G), las células de la teca (T) y cuerpos apoptóticos (CA).

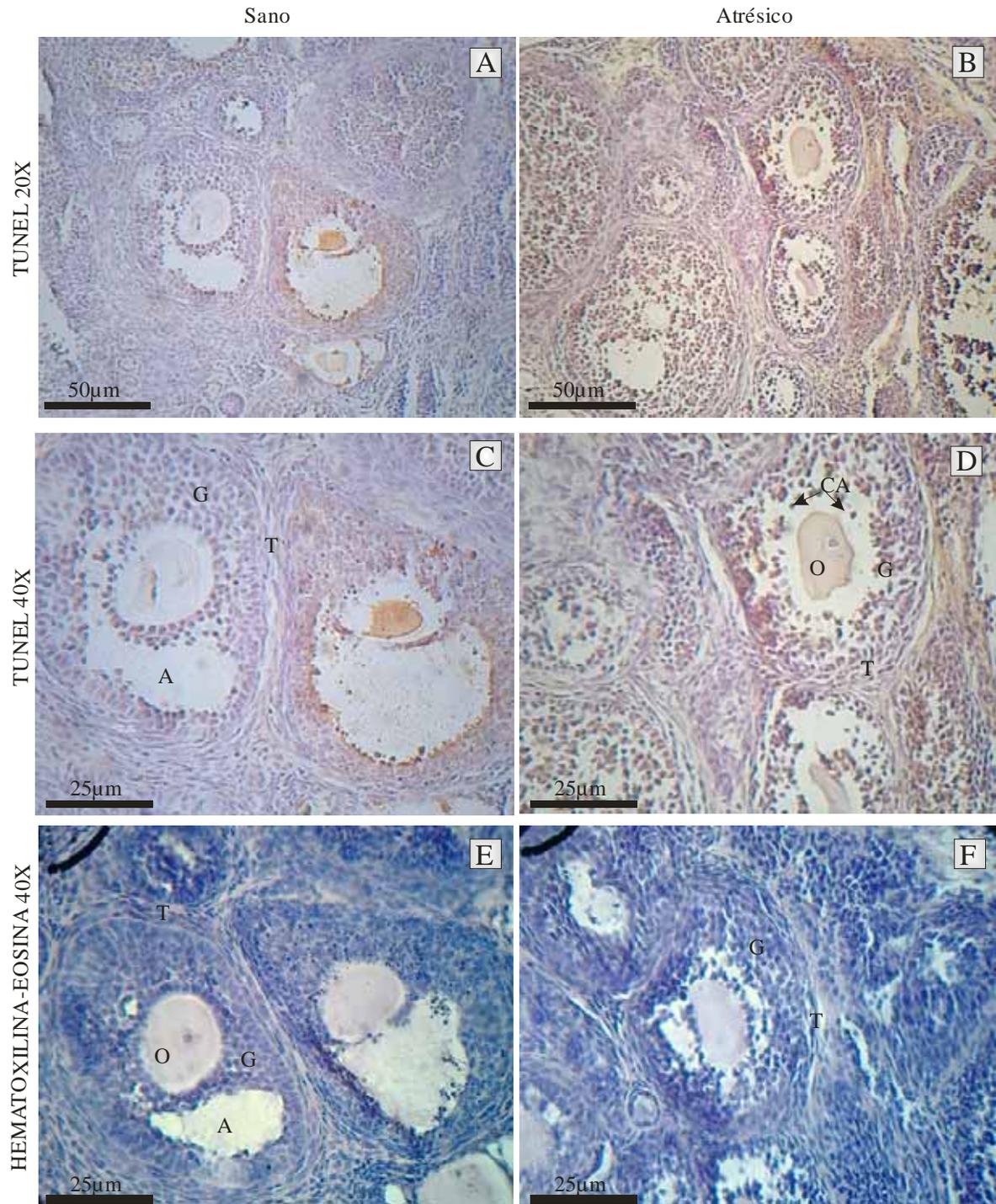


Figura 17. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) teñidos mediante la técnica de TUNEL (A, B, C y D) o Hematoxilina-Eosina (E y F) donde se observan folículos de clase 2 sanos (A, C y E) y atrésicos (B, D y F). Se observa el ovocito (O), el antro folicular (A), las células de la granulosa (G), las células de la teca (T) y cuerpos apoptóticos (CA).

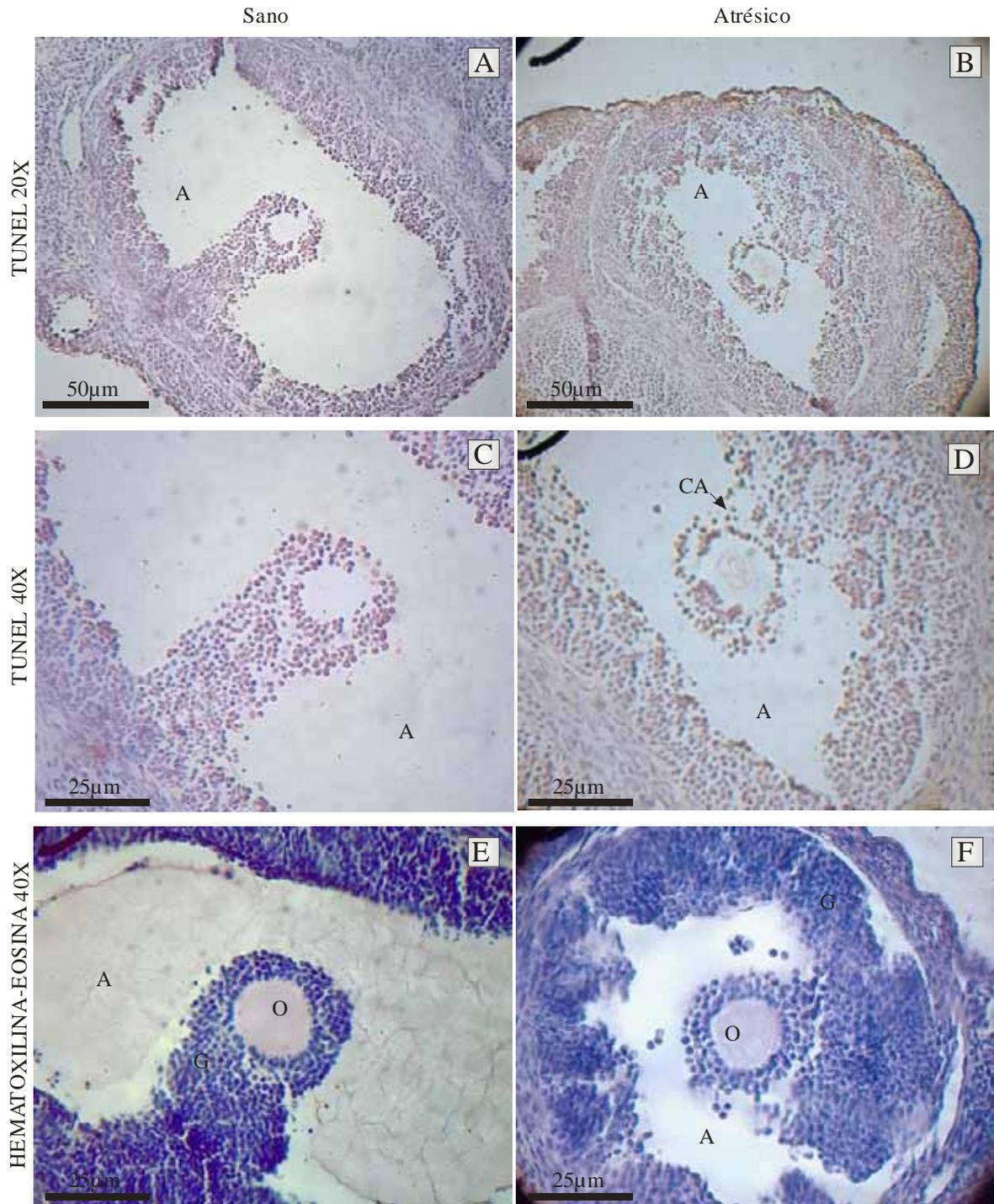
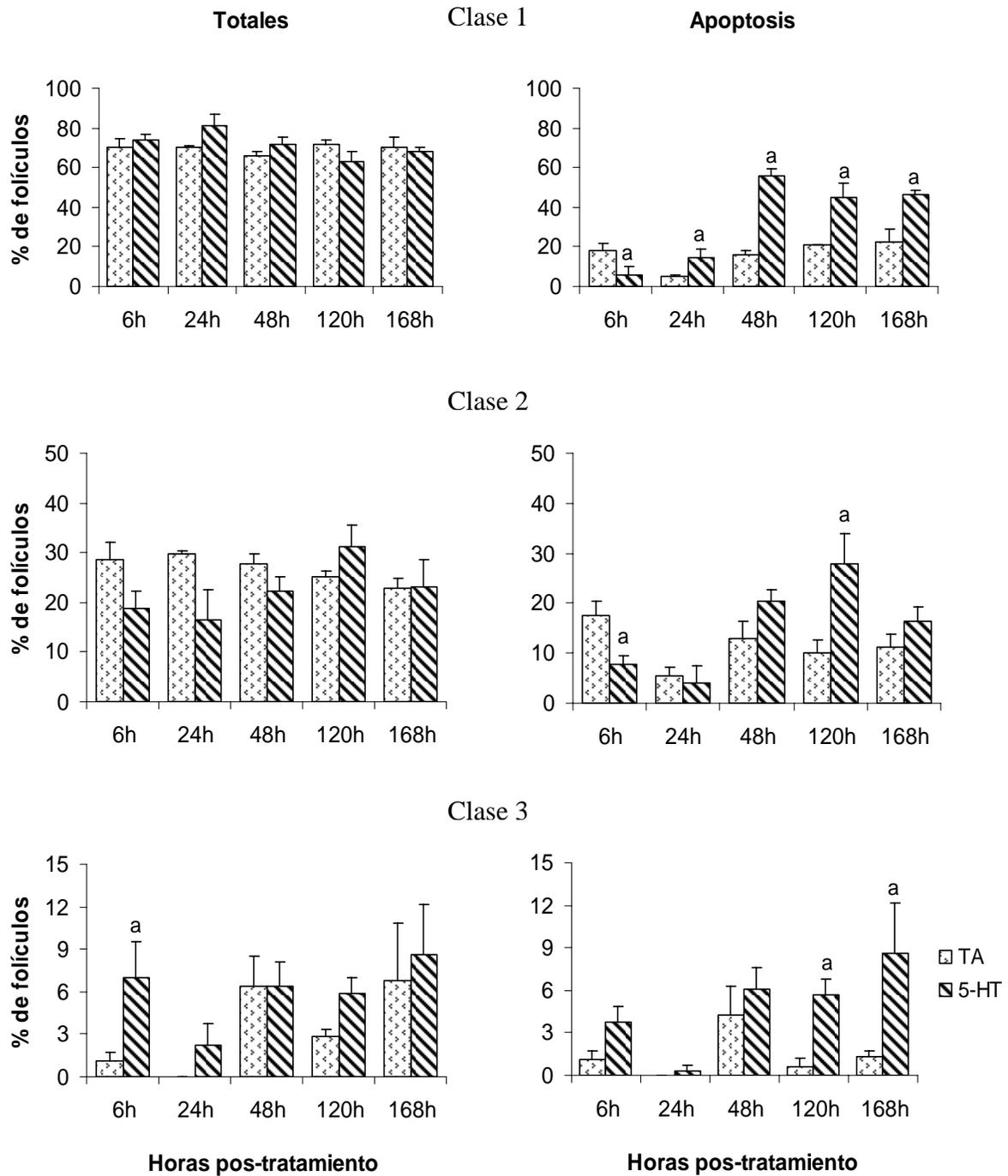
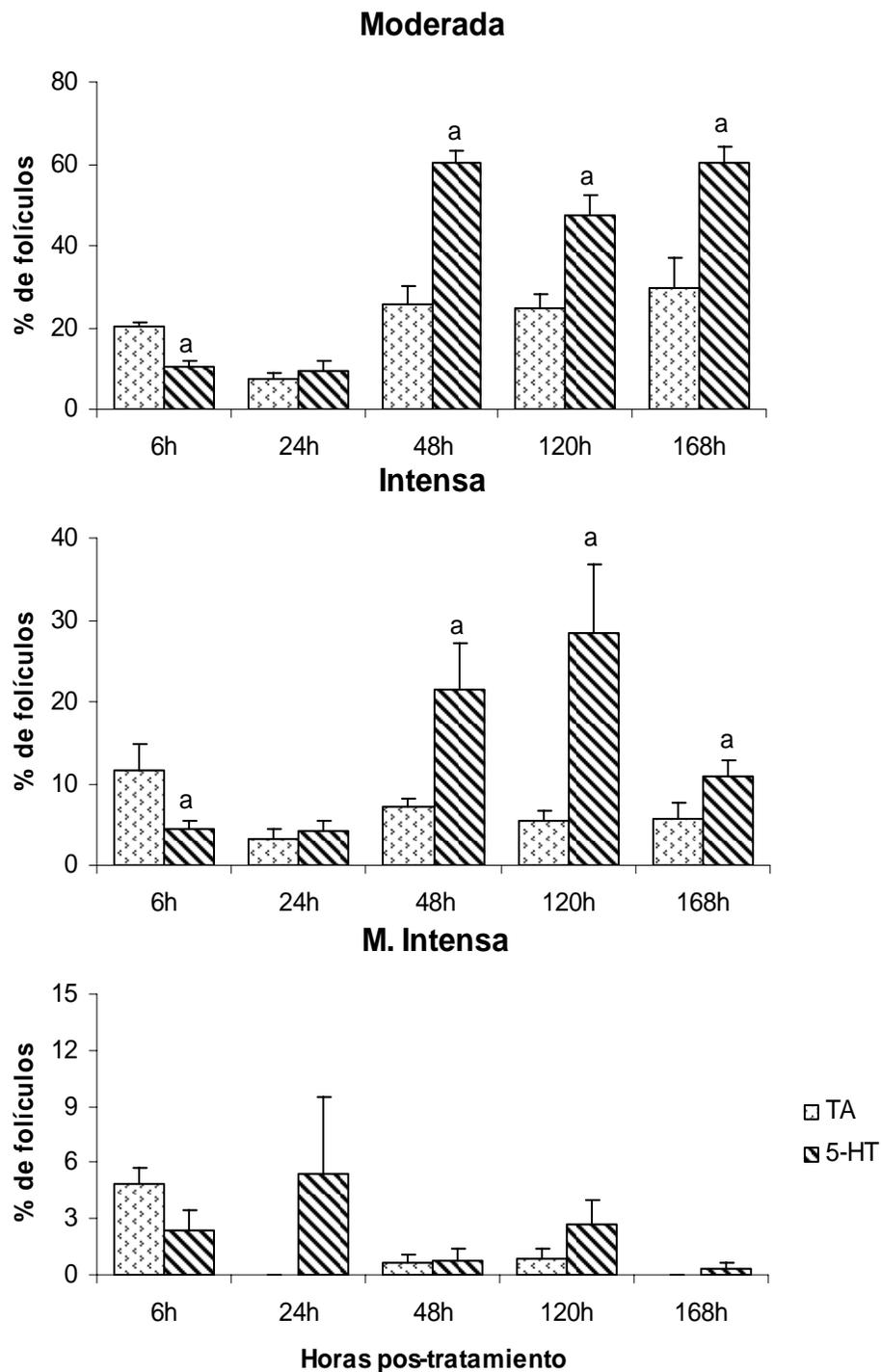


Figura 18. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) teñidos mediante la técnica de TUNEL (A, B, C y D) o Hematoxilina-Eosina (E y F) donde se observan folículos de clase 3 sanos (A, C y E) y atrésicos (B, D y F). Se observa el ovocito (O), el antro folicular (A), las células de la granulosa (G) y cuerpos apoptóticos (CA).



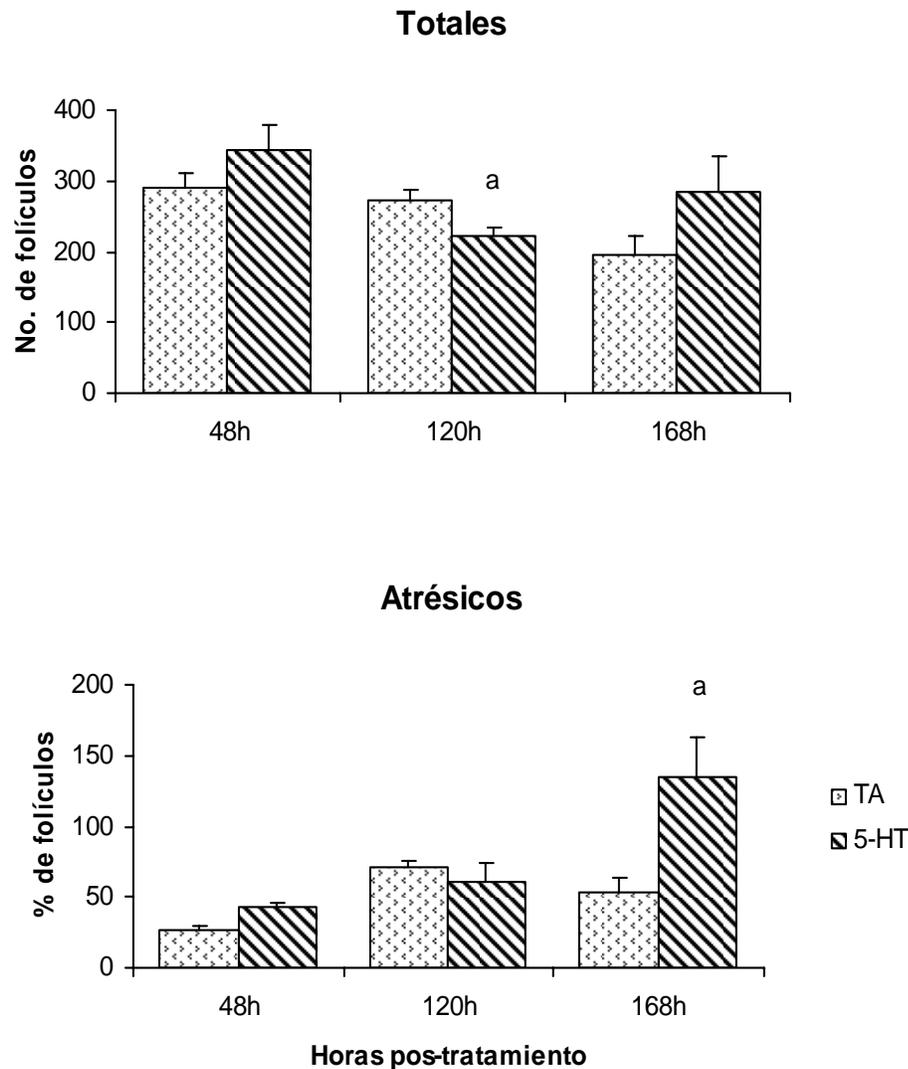
a, $p < 0.05$ vs. TA (prueba Ji Cuadrada).

Figura 15. Porcentaje de folículos totales y con células en apoptosis de las clases 1, 2 y 3 medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento.



a, $p < 0.05$ vs. TA (prueba Ji Cuadrada).

Figura 16. Porcentaje de folículos que presentaron marca moderada, intensa o muy intensa medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento que presentaron marca moderada, intensa o muy intensa por la técnica de TUNEL.



a, $p < 0.05$ vs. TA (prueba "t" de Student).

Figura 17. Número de folículos totales y porcentaje de folículos atrésicos medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento.

2. Efecto de la administración de serotonina en la bursa del ovario durante la etapa prepuberal

Concentración de esteroides en suero

En los animales que fueron anestesiados con éter (E), que se sometieron a una operación simulada (OS) o a los que se les administro solución salina (Sal) en la bursa del ovario y que se sacrificaron 6 ó 24 horas después de la operación la concentración

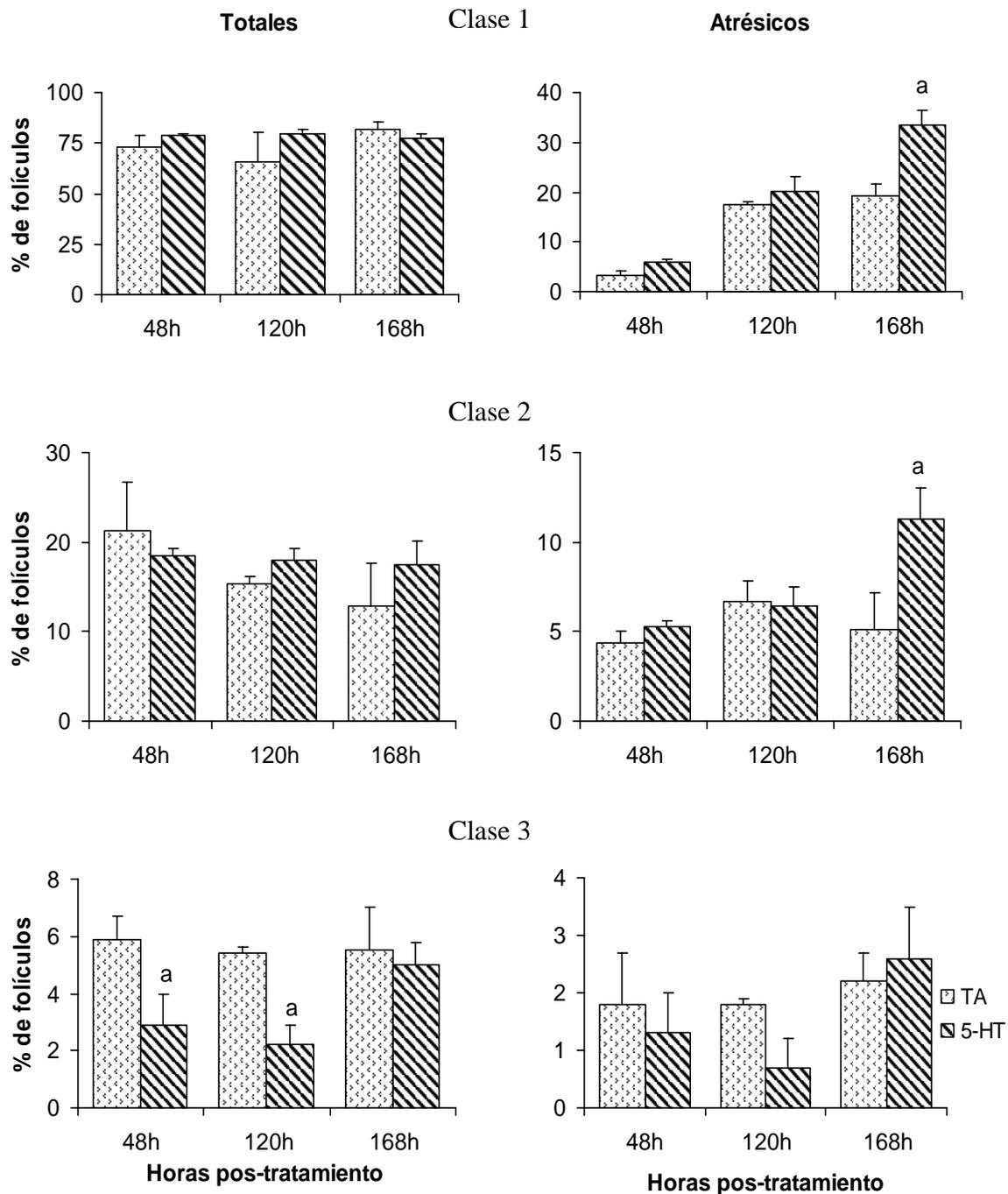
sérica de progesterona fue menor en comparación con el grupo de animales testigo absoluto (TA) [6h: (E) 6.7 ± 1.5 , (OS) 11.5 ± 1.1 , (Sal) 12.2 ± 1.5 vs. (TA) 16.2 ± 1.2 ; 24h: (E) 6.6 ± 1.6 , (OS) 11.9 ± 2.1 , (Sal) 3.9 ± 0.8 vs. (TA) 11.2 ± 1.4 , $p < 0.05$]. Por el contrario, la concentración de 17β -estradiol fue mayor en los grupos E, OS y Sal en comparación con el grupo TA a las 6 y a las 24 horas después de la operación [6h: (E) 20.1 ± 2.3 , (OS) 19.5 ± 1.1 , (Sal) 19.4 ± 1.8 vs. (TA) 14.3 ± 0.6 ; 24h: (E) 23.2 ± 3.7 , (OS) 27.8 ± 1.0 , (Sal) 24.8 ± 2.0 vs. (TA) 18.7 ± 0.9 , $p < 0.05$].

Cuando se evaluó la concentración de progesterona, testosterona y 17β -estradiol entre el grupo de animales que fueron anestesiados con éter y el grupo al que se le administro solución salina en la bursa del ovario no se observaron diferencias significativas en ninguna de las edades estudiadas. Con base en esto los efectos producidos por la administración de sulfato de serotonina en la bursa del ovario se compararon con el grupo de animales que recibieron solución salina.

La concentración de hormonas esteroides de los animales que recibieron solución salina o sulfato de serotonina en la cavidad de la bursa del ovario se muestra en la figura 19. En comparación con el grupo de animales testigo absoluto la concentración de progesterona fue mayor en el grupo de animales que recibieron sulfato de serotonina y que fueron sacrificados a las 6 y a las 48 horas post-tratamiento. La concentración de testosterona fue menor en los animales tratados con serotonina y que fueron sacrificados a las 12 y 48 horas. Mientras que la concentración de estradiol fue menor en los animales sacrificados a las 12 y 24 horas después de ser tratados con serotonina.

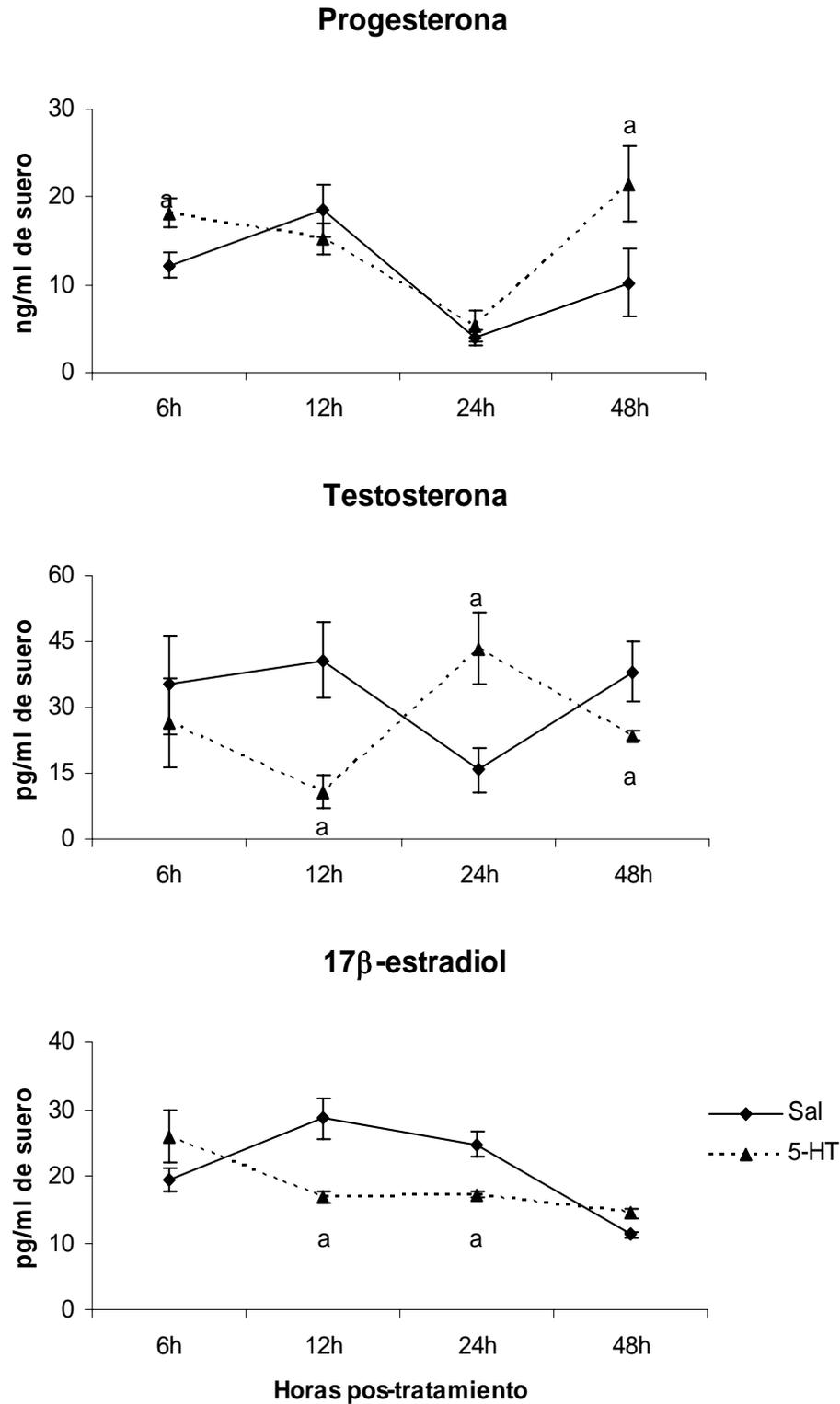
Expresión de bcl-2 y bax

Cuando se evaluó la expresión de los genes bcl-2 y bax en los animales a los que se les administró sulfato de serotonina en la bursa del ovario no se observaron modificaciones en ninguna de las edades estudiadas en comparación con los animales que recibieron solución salina.



a, $p < 0.05$ vs. TA (prueba Ji Cuadrada).

Figura 18. Porcentaje de folículos totales y atrésicos de clase 1, 2 y 3 medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (5-HT) y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento.



a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student).

Figura 19. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de progesterona, testosterona y 17 β -estradiol de ratas con administración de solución salina o sulfato de serotonina (5-HT) en la bursa del ovario y sacrificadas a diferentes horas después de iniciar el tratamiento.

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que la serotonina induce los procesos de apoptosis y atresia folicular, lo cual podría ser efecto de las modificaciones en el proceso de esteroidogénesis inducidas por la serotonina, principalmente en la síntesis de 17β -estradiol, dado que en estudios *in vitro* se ha mostrado que la serotonina participa en la regulación de la esteroidogénesis en el cuerpo lúteo de vaca y en folículos preovulatorios (Battista, 1986; Tanaka y col, 1993).

En este estudio se mostró que la administración sistémica de serotonina disminuye la concentración sérica de progesterona y estradiol, lo cual difiere de lo observado por Tanaka y colaboradores (1993), quienes mostraron que en folículos preovulatorios de rata mantenidos en cultivo la concentración de progesterona, testosterona y estradiol disminuye después de adicionar ketanserina (antagonista de los receptores a serotonina $5-HT_1$ y $5-HT_2$) al medio de cultivo. En otro estudio en el que se mantuvieron células de la granulosa en cultivo, y se le adiciona serotonina al medio se estimula la síntesis de progesterona y de estradiol (Bódis y col., 1992). Posiblemente la diferencia entre los resultados reportados por otros autores y los obtenidos en este estudio, en el animal prepúber, se deban a que la serotonina tiene un efecto diferencial en la regulación de la esteroidogénesis a lo largo del desarrollo del animal, como ya se ha mostrado que sucede con la liberación de la LH (Arias y col., 1990), sin embargo también debe tomarse en cuenta que estos estudios fueron realizados *in vitro* mientras que el presente estudio se realizó *in vivo*.

La menor concentración de progesterona observada en los animales que fueron tratados con serotonina y sacrificados a las 120 horas después de iniciar el tratamiento es probable que sea resultado de la acción de la serotonina sobre la secreción de gonadotropinas, en particular de la LH (Vitale y col., 1986; Arias y col., 1990). La disminución en la secreción de esta hormona resulta en la disminución en la síntesis

de progesterona por parte de las células de la teca en el folículo ovárico, ya que se ha mostrado que la LH activa al complejo enzimático P450_{scc}, el cual es responsable de la transformación de colesterol en progesterona (Domínguez y col, 1991; Gore-Langton y Armstrong, 1994). Sin embargo, esta disminución en la concentración de progesterona no se observa en los animales sacrificados a las 168 horas, lo cual nos permite pensar que esto es resultado de modificaciones en la secreción de otros factores involucrados en la modulación de la síntesis de esta hormona. Esta idea es apoyada por el hecho de que la serotonina estimula la secreción del IGF-I e inhibe la secreción de progesterona en las células de la granulosa del humano mantenidas en cultivos (Schaeffer y Sirotkin, 1997).

Otra posibilidad es que la serotonina inhiba la secreción de progesterona por las glándulas adrenales, las cuales se ha mostrado que producen mayor cantidad de progesterona que los ovarios de la rata adulta en proestro (Flores y col., 2005), sin embargo no existe información sobre la posibilidad de que la serotonina actúe directamente en la glándula adrenal modificando la esteroidogénesis.

La menor concentración de 17 β -estradiol que se observo en las ratas tratadas con serotonina desde las 18 hasta las 168 horas después de iniciar el tratamiento posiblemente es el resultado de la acción de la serotonina directamente en el ovario. Aunque no existen estudios de inmunohistoquímica en los que se muestre la presencia de los receptores a serotonina en el ovario, en estudios farmacológicos en los que se administra ketanserina (antagonista de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂) o metilsergide (antagonista de los receptores 5-HT₁) se sugiere la existencia de estos tipos de receptores en el ovario de la rata (Schmidt y col., 1988). Así mismo se ha mostrado que cuando folículos preovulatorios de rata adulta que se mantienen en cultivo, se les adiciona la ketanserina, se inhibe la producción de progesterona, testosterona y estradiol, lo que llevó a los autores a proponer que en la rata adulta la serotonina ejerce un papel estimulante en la esteroidogénesis (Tanaka y col., 1993).

Sin embargo, en nuestro estudio se observó que cuando a la rata prepúber se le administra el sulfato de serotonina se inhibe la producción de 17β -estradiol. Con base en los resultados reportados por otros autores y los de este estudio es posible sugerir que la serotonina tiene un efecto diferencial en la regulación de la esteroidogénesis. Este efecto diferencial de la serotonina también ha sido reportado en la secreción de la LH (Arias y col., 1990; Bodis y col., 1992).

Es posible que papel diferencial que ejerce la serotonina en la regulación de la esteroidogénesis este asociado al tipo de receptor que se exprese en los compartimientos del ovario, 5-HT₁ o 5-HT₂. La idea de que la activación de uno u otro tipo de receptor se refleja en una respuesta diferencial se ha mostrado en la secreción de las gonadotropinas. Cuando se activa el receptor 5-HT₁ se incrementa la secreción de la FSH y la LH, mientras que cuando se activa el receptor 5-HT₂ únicamente se estimula la secreción de FSH (Gouveia y Rodrigues, 2004).

La disminución en la concentración de 17β -estradiol observada en los animales que recibieron sulfato de serotonina es el resultado de la acción de la serotonina directamente en el ovario, como ha sido mostrado por Tanaka y colaboradores (1993). La disminución en la concentración de esta hormona no se acompañó de modificaciones en la concentración de FSH, hormona que activa el complejo enzimático que cataliza la aromatización de los andrógenos a estrógenos al unirse a su receptor en las células de la granulosa (Van Voorhis, 1999), sin embargo la LH también participa en la regulación de la síntesis de 17β -estradiol y es posible que la disminución en la concentración de esta gonadotropina resulte en la disminución en la síntesis de estradiol (Dhalí y col., 2006). La idea de que la serotonina afectó esta vía de transformación de los andrógenos a estrógenos se basa en las evidencias reportadas en las que se muestra que en el ovario de la mujer se encuentran receptores a serotonina en las células de la granulosa que pueden inhibir la acción de segundos mensajeros impidiendo que se active la aromatasa responsable de la

transformación de andrógenos a estrógenos (Yie y col., 1995; Graveleau y col., 2000). Por ello, es posible pensar que la serotonina inhibió la acción de la FSH en las células de la granulosa y como consecuencia la síntesis de los estrógenos.

La menor concentración de LH y la mayor concentración de FSH observados en los animales que recibieron serotonina posiblemente son el resultado de que se altero la liberación de GnRH sin modificar su síntesis, ya que se ha mostrado que la serotonina administrada por vía sistémica no atraviesa la barrera hematoencefálica debido a que esta es una molécula hidrofílica (Bouchaud, 1972). Sin embargo es posible que la amina actúe en la eminencia media, que se encuentra fuera de esta barrera. Además existen evidencias anatómicas en las que se muestra que en la eminencia media existe comunicación entre las terminales GnRHérgicas y las terminales de las neuronas productoras de serotonina (Jennes y col., 1982). La idea de que la serotonina modifica la liberación de la GnRH es apoyada por el estudio realizado por Vitale y colaboradores (1986), en el que mostraron que en la rata hembra en proestro la serotonina estimula la liberación de la LHRH en eminencia media mantenida en un sistema de perfusión. Otra posibilidad es que la serotonina modifique la secreción de las gonadotropinas al actuar directamente en el gonadotropo, donde hay captura de serotonina, resultando en el aumento en la liberación de FSH y la disminución en la de LH.

Es posible que la mayor concentración de FSH en el suero de los animales que fueron tratados con sulfato de serotonina sea resultado de la acción de la amina en la hipófisis, donde posiblemente regula la secreción de las gonadotropinas, ya que por estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado que en los gonadotropos hay captura de serotonina, sin embargo se desconoce su función (Johns y col., 1982). También existen evidencias de que hay inervación serotoninérgica que llega a la hipófisis anterior y a la hipófisis intermedia (Westlund y Childs, 1982), por ello es posible pensar que la serotonina participa en la regulación de la secreción de

hormonas hipofisiarias por sus efectos directos en esta glándula. Otra posibilidad es que la serotonina regule la cantidad de GnRH que llega a la hipófisis, al actuar como vasoconstrictor en el sistema portal hipotálamo-hipofisiario. Se ha mostrado que en las arterias que irrigan al hígado, al riñón y testículo esta amina actúa como vasoconstrictor o vasodilatador (Endlich y col., 1993; Verbeke, 1996). Mientras que en sistema nervioso esta amina actúa como vasoconstrictor en la arteria cerebral y en la arteria basilar (Suzuki y col., 2006).

La disminución en la concentración de LH que se observó a partir de las 24 horas después de iniciar el tratamiento con sulfato de serotonina y que se mantuvo hasta las 168 horas, no coincide con lo observado por otros autores en el animal adulto, en donde la serotonina estimula la secreción de LH (Vitale y col., 1986). Sin embargo, también existen evidencias de que este neurotransmisor ejerce un papel diferencial en la secreción de la LH. En la rata hembra de 16 a 20 días de edad la serotonina estimula la secreción de la LH y en los días 26 y 30 no se observa este efecto, el efecto diferencial de la serotonina en la secreción de LH se sugiere que está asociado a la secreción de estrógenos y progesterona en estas etapas del desarrollo prepuberal (Arias y col., 1990), con base en estas evidencias es posible pensar que entre los días 31 y 37 de edad, la serotonina participe de manera inhibitoria en la modulación de la secreción de esta gonadotropina. Sin embargo no es posible descartar que la serotonina actúe directamente en la hipófisis donde hay inervación serotoninérgica y captura de serotonina en los gonadotropos (Johns y col., 1982; Westlund y Childs, 1982).

La administración de sulfato de serotonina ejerció un efecto diferencial en la secreción de las gonadotropinas, debido a que incrementó la concentración de FSH y disminuyó la de LH. Este efecto de la serotonina en la secreción de estas hormonas ya ha sido observada por otros autores, quienes mostraron que la administración de un precursor de la serotonina, el 5-hidroxitriptofano, a ratas prepúberes entre los 16 y los 30 días no modifica la secreción de la FSH (Justo y col., 1989), mientras que la

secreción de LH aumenta del día 16 al 20 sin que se modifique en las edades posteriores (Moguilevsky y col., 1985; Arias y col., 1990). La participación diferencial de la serotonina tal vez sea resultado de su acción sobre diferentes tipos de receptor, ya que se ha mostrado que la estimulación del receptor 5-HT₁ aumenta la secreción de FSH y LH y al estimular el receptor 5-HT₂ solo aumenta la secreción de FSH (Gouveia y Rodrigues, 2004). Otra posible explicación sería que la serotonina participó en la modulación de la secreción de más de un factor liberador de las gonadotropinas, uno para LH y otro para FSH. La existencia de más de un factor liberador ha sido propuesta por McCann y colaboradores (2003). Lumpkin y colaboradores (1989) mostraron que cuando se realizan lesiones del área hipotalámica anterior en ratas hembras adultas no se presenta la secreción pulsátil de la FSH y no se modifica la de la LH. Un efecto similar se observó cuando se lesiona la eminencia media (Marubayashi y col., 1999), por lo cual es posible pensar que la serotonina regula de manera diferencial la secreción de las gonadotropinas en función del tipo de receptor que este expresado y del sitio que se estimule.

El aumento en la expresión del gen bcl-2 24 y 48 horas después de iniciar el tratamiento con serotonina posiblemente sea una respuesta de las células hacia la disminución de la concentración de 17β-estradiol, el cual actúa como factor de sobrevivencia (Billig y col., 1993). Así mismo, se ha mostrado que cuando disminuye la concentración de esta hormona se induce la muerte de la célula de la granulosa por apoptosis (Tilly, 1992). Existen evidencias en las que se señala que la proteína bcl-2 actúa como factor de sobrevivencia de la célula debido a que se ubica en la membrana de la mitocondria e impide que se libere el citocromo c y se active la muerte celular por apoptosis (Billig y col, 1993; Tilly, 1996). En este estudio observamos que en los animales que recibieron sulfato de serotonina el aumento en la expresión del gen bcl-2 no impidió la muerte de la célula, de forma similar a lo que se mostró en la corteza cerebral, región en la que al aumentar el proceso de muerte celular por apoptosis también se incrementa la expresión de bcl-2 a las 6, 12 y 24 horas. Sin embargo,

existen evidencias en las que se ha mostrado que la proteína bcl-2 se localiza, además de en la membrana externa de la mitocondria, en el núcleo y en el retículo endoplásmico (Kukley, 2001), por lo que es posible pensar que la proteína sintetizada a partir del ARN mensajero no actuó en la mitocondria, posiblemente al ser dirigida hacia otros organelos, y por lo tanto no impidió que se llevaran a cabo los eventos que desencadenan el proceso de apoptosis.

El aumento en expresión del gen bax a las 24 horas después de iniciar el tratamiento con serotonina, posiblemente es la respuesta a la disminución de factores de sobrevivencia como son la LH y el 17β -estradiol. Bone y Tsang (1998) mostraron que en ausencia de estos factores se incremento la proteína bax en la membrana de la mitocondria, lo que permitió la salida del citocromo c, que al unirse a la procaspasa 9 y al APAF-1 da inicio a la activación de una cascada de caspasas que culmina con la muerte de la célula. Esta serie de eventos conducen posteriormente a la atresia del folículo ovárico. El aumento en la expresión de la proteína bax que observamos en el ovario de los animales que recibieron sulfato de serotonina coincide con lo observado por Kukley y colaboradores (2001) en corteza cerebral, mostraron que la serotonina al actuar sobre los receptores 5-HT_1 aumenta la expresión de bax y la apoptosis a partir de las 6 horas después de administrarla y se mantiene este efecto hasta las 24 horas. En otro estudio realizado con folículos antrales en los cuales se indujo la muerte celular por apoptosis al mantenerlos en medio de cultivo en ausencia de eCG, se observó que aumenta la expresión de bax después de 24 horas de cultivo (Tilly y col., 1995). Con base en lo reportado en la bibliografía y lo observado en este estudio, es posible pensar que como resultado de la disminución en algunos factores de sobrevivencia (LH y estradiol), la expresión de bax (gen proapoptótico) aumenta en tiempos cortos.

La disminución en la concentración de 17β -estradiol, de LH y el aumento en la expresión de los genes bax y bcl-2 a las 24 horas pos-tratamiento, también se

acompañó del aumento en la actividad de la caspasa 3, la cual es considerada una de las caspasas efectoras del proceso de apoptosis. El aumento en la actividad de esta caspasa tal vez resulta del aumento en la permeabilidad de la membrana externa de la mitocondria en respuesta al aumento de la proteína bax, liberación del citocromo c y la activación de la cascada de caspasas, entre ellas la caspasa 3 (Figura 20) (Billig y col., 1993). Sin embargo, no es posible descartar que el aumento en la actividad de la caspasa 3 sea resultado de la activación de los receptores de muerte por sus ligandos, por ejemplo el TNF- α , lo que incrementa la actividad de la caspasa 8 y posteriormente la caspasa 3 de forma independiente a las modificaciones en la expresión de bax y bcl-2. Esta vía de activación se conoce como la vía extrínseca y se ha mostrado que se produce en el ovario (Hussein M., 2005; Matsuda-Minehata y col., 2006). Por lo que resulta necesario evaluar en estudios posteriores si esta vía es activada tras la administración de sulfato de serotonina (Figura 20).

El aumento en la proporción de folículos que presentaron células reactivas a TUNEL en los animales que fueron tratados con sulfato de serotonina a partir de las 24 horas, posiblemente sea resultado del aumento en la actividad de la caspasa 3, que es la responsable de la activación de la enzima DNasa I que fragmenta al ADN (Boone y col., 1995; Boone y Tsang, 1997). En estudios realizados en linfocitos se mostró que 24 horas después de inducir el proceso de apoptosis hay aumento de la concentración de citocromo c en el citosol de la célula, y que esto es acompañado de aumento en la actividad de las caspasas 3 y 9, y la fragmentación de ADN se presenta hasta las 48 horas después de inducir la muerte (Pires y col., 2007). Esta secuencia de eventos coincide con lo observado en nuestro estudio en cuanto al aumento en la actividad de la caspasa 3 y la fragmentación de ADN por TUNEL.

El aumento en la proporción de folículos con marca moderada e intensa que se observó en los animales que recibieron serotonina y sacrificados a las 48, 120 ó 168 horas posiblemente es el resultado de que un mayor número de folículos iniciaron el

proceso de atresia en respuesta a la disminución en la concentración de 17β -estradiol, hormona que mantiene la multiplicación de las células de la granulosa (Billig y col., 1993).

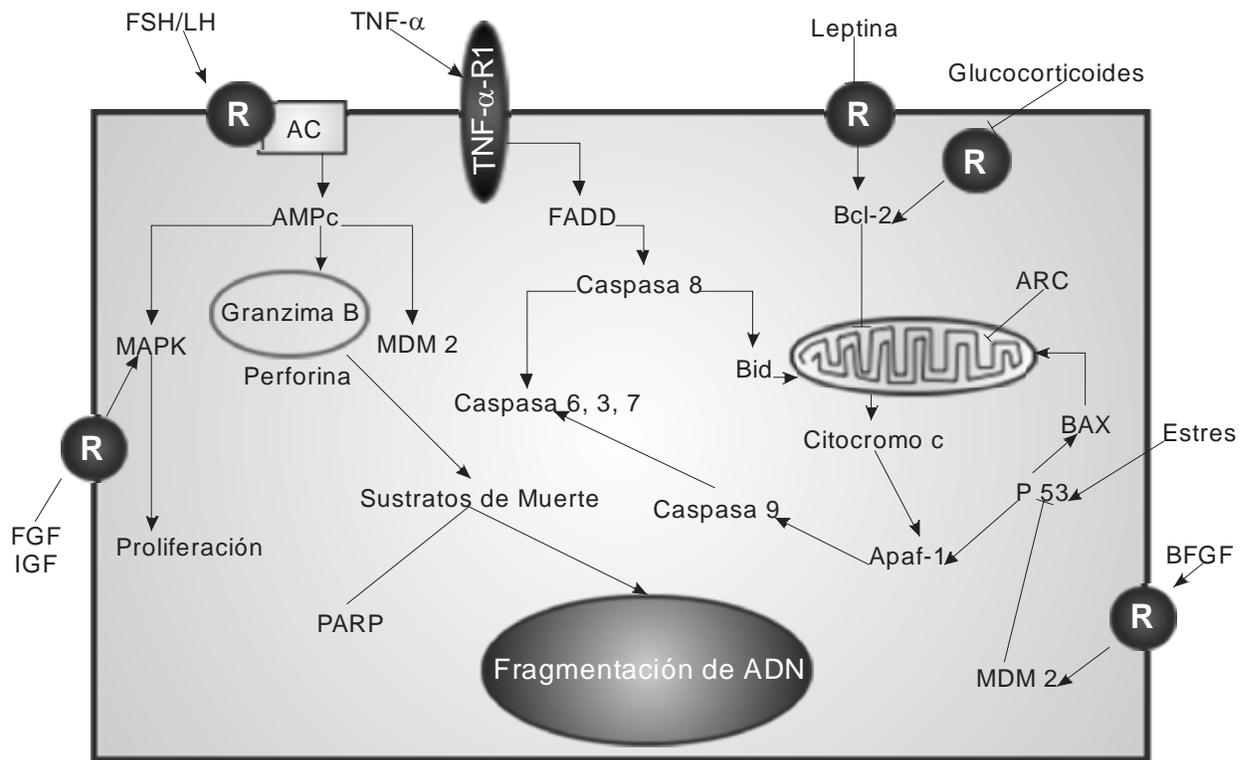


Figura 20. Vías alternativas que regulan la apoptosis en las células de la granulosa . R (Receptor), TNF- α (Factor necrosis tumoral α), FSH (Hormona estimulante del folículo), LH (Hormona luteinizante), FGF (Factor de crecimiento fibroblástico), IGF (Factor de crecimiento parecido a la insulina), MAPK (MAP cinasa), FADD (Proteína con dominio de muerte asociada a FAS), MDM 2 (gen murino de doble minuto), PARP (Polimerasa poli(ADP-ribosa)), ARC (Receptor apoptótico) (Modificado de: Ámsterdam y col., 2003).

El incremento en la incidencia de atresia, que se observo en los animales tratados con serotonina, evidente a las 168 horas, es el resultado de la activación del proceso de apoptosis que inicio a las 24 horas pos-tratamiento, como se evidenció por el aumento en la expresión de bax y la actividad de la caspasa 3 (Figura 21). Hasta el momento no hay evidencias de cuanto tiempo tarda un folículo en ser atrésico después de que se inicia el proceso de apoptosis. La mayoría de los estudios realizados hasta el momento han sido dirigidos a estudiar los factores y los

mecanismos que inducen o inhiben la apoptosis y la atresia del folículo (Hussein, 2005; Matsuda-Minehata y col, 2006).

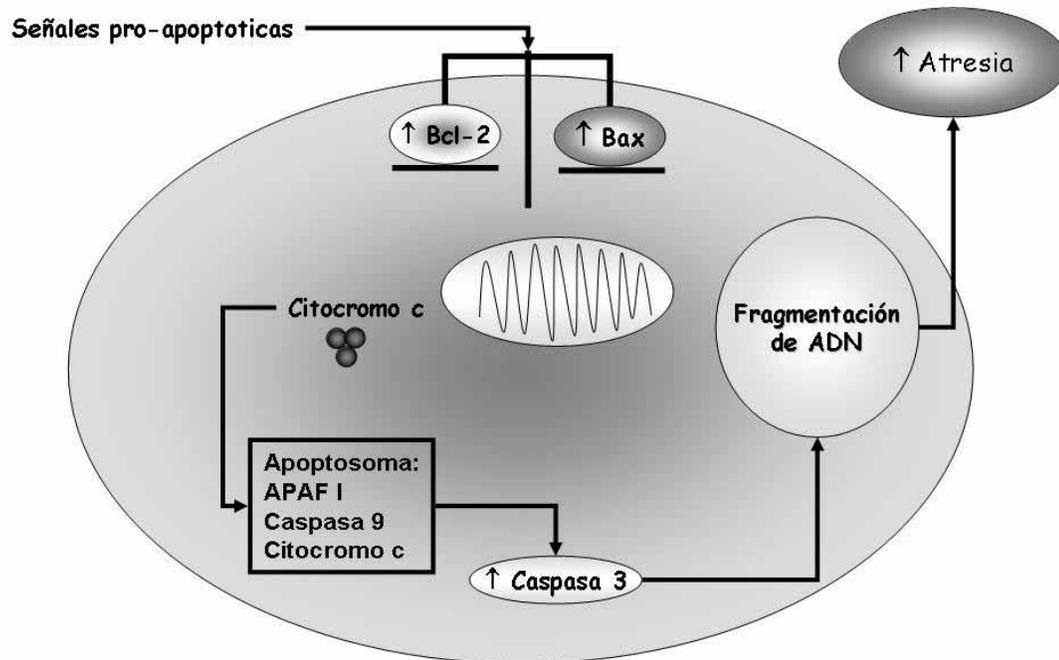


Figura 21. Eventos que se presentan en la célula de la granulosa después de la administración sistémica de sulfato de serotonina. APAF I (Factor activador de la proteasa I), ADN (Ácido desoxiribonucleico).

El aumento en la proporción de folículos atrésicos de clase 1 y 2 observado en los animales que fueron tratados con serotonina y sacrificados a las 168 horas, posiblemente sea resultado de que estos folículos tienen una mayor sensibilidad a la ausencia de factores antiapoptóticos, como la LH y el estradiol, ya que en los folículos pequeños uno de los principales factores de sobrevivencia es el estradiol, y en menor proporción los factores de crecimiento, en los folículos de clase 1 la expresión de receptores para la LH se mantiene baja en comparación con las siguientes etapas de desarrollo, sin embargo no es posible descartar que la disminución en la concentración de LH este relacionada con el aumento de la atresia de los folículos (Morita y Tilly, 1999). Para los folículos de clase 2 los principales factores de

sobrevivencia son los estrógenos, la progesterona, las gonadotropinas y los factores de crecimiento, durante esta etapa la expresión de los receptores para hormonas esteroides y gonadotropinas es mayor en comparación con los de clase 1, las gonadotropinas actúan de forma sinérgica para inducir la expresión de los receptores a estrógenos y el crecimiento y diferenciación del folículo (McGee y col., 1998), mientras que en los folículos preovulatorios se ha mostrado que el principal factor de sobrevivencia es la FSH seguido por la LH, la progesterona y el estradiol (Chun y col., 1996). Estas evidencias nos permiten pensar que la disminución en la concentración de estradiol posiblemente indujo la atresia de folículos pequeños y medianos, mientras que los preovulatorios fueron más resistentes a la menor concentración de esta hormona.

En los ovarios de los animales que fueron tratados con sulfato de serotonina se observaron folículos en las diferentes etapas del desarrollo, posiblemente como resultado de que no disminuyó la concentración de FSH. Esta gonadotropina es necesaria para que el folículo continúe su desarrollo hacia la etapa de folículo antral y preovulatorio, en ausencia de este estímulo el folículo detiene su crecimiento y degenera por atresia (Hsueh y col., 1994). Sin embargo, aumentó la proporción de folículos atrésicos, posiblemente como resultado de la disminución en la concentración de LH, la cual actúa como un factor de sobrevivencia del folículo, también participa en la síntesis de hormonas esteroides y estimula la producción de receptores a FSH por la granulosa (Roche, 1996).

La menor concentración de 17β -estradiol que se observó a las 12 y 24 horas después de administrar la serotonina en la bursa del ovario, posiblemente es resultado de la acción directa de esta amina en las células de la granulosa. En el ovario de la mujer esta amina inhibe la producción de segundos mensajeros, como el AMPc, que es parte de la cascada de señalización que culmina con la activación de la

enzima aromatasa responsable de la transformación de andrógenos a estrógenos (Figura 22) (Yie y col., 1995; Gravelleau y col., 2000).

En conjunto los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten pensar que la serotonina actuaría directamente en el ovario donde disminuye la concentración de estradiol, posiblemente al disminuir la actividad de la enzima aromatasa, y en consecuencia impide el crecimiento y diferenciación del folículo, que conduce a la muerte de las células de la granulosa y la atresia del folículo. También es posible que la serotonina actúe a nivel de eminencia media o directamente en la hipófisis, donde modifica la secreción de las gonadotropinas, disminuye la concentración de LH y aumenta la de FSH, y en consecuencia modifica las funciones del ovario, en particular la esteroidogénesis, lo cual resulta en la disminución de la concentración de estradiol, la muerte de las células de la granulosa por apoptosis y la atresia del folículo ovárico (Figura 23).

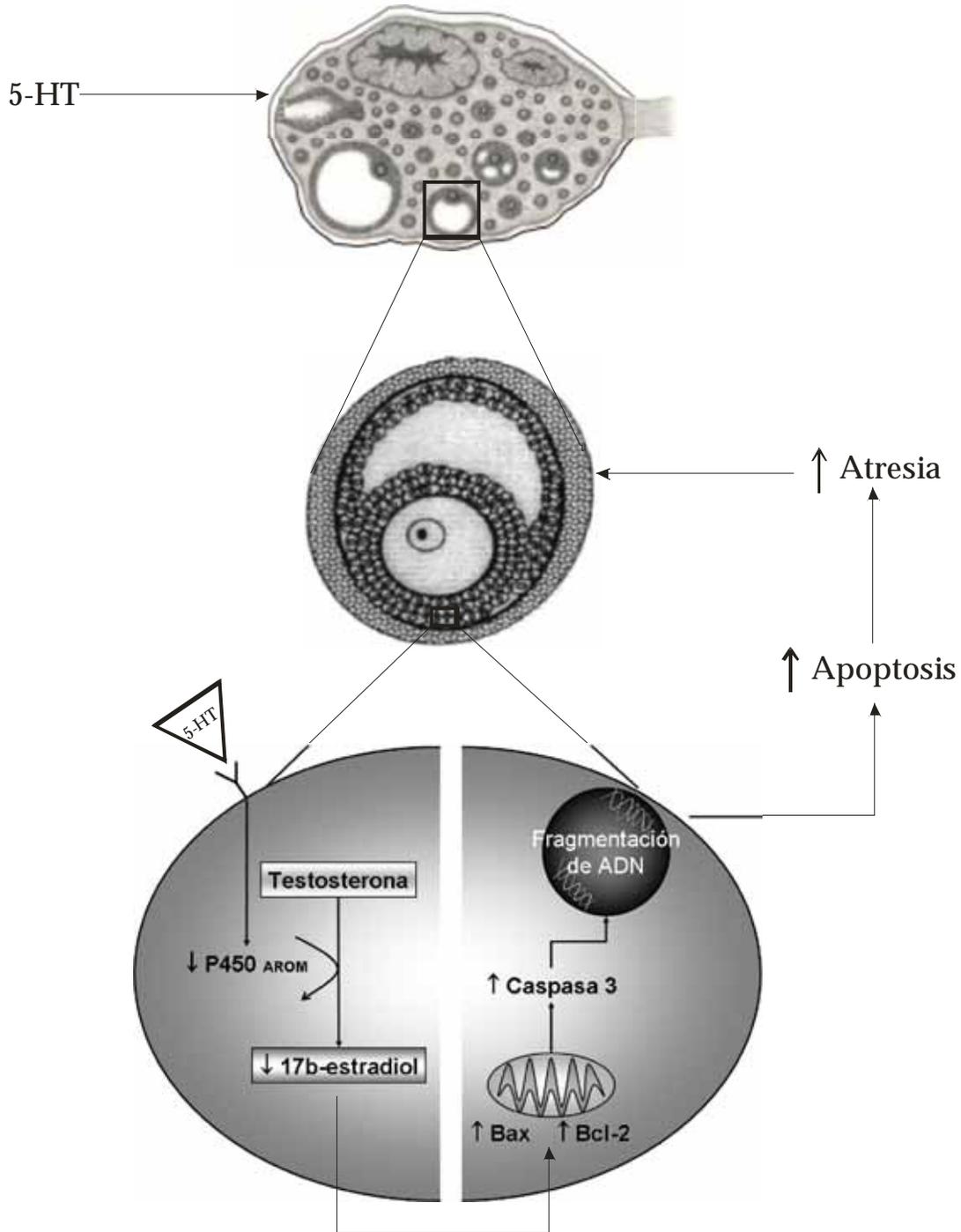


Figura 22. Eventos que se presentan en el ovario después de la administración sistémica de sulfato de serotonina a ratas durante el desarrollo prepuberal. 5-HT (Sulfato de serotonina); ADN (Ácido desoxirribonucleico).

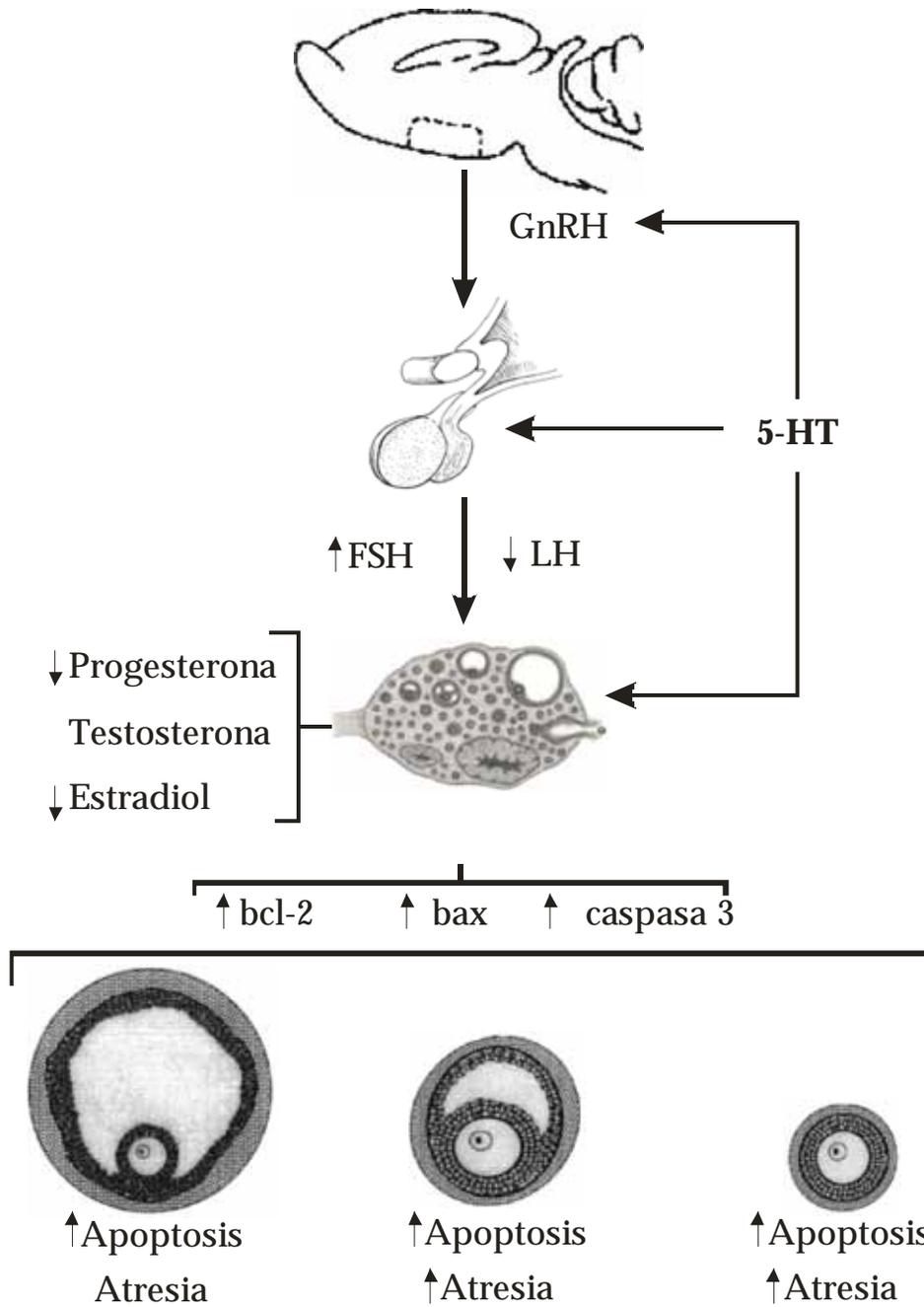


Figura 23. Eventos que se presentan después de la administración sistémica de sulfato de serotonina a ratas durante el desarrollo prepuberal. GnRH (Hormona liberadora de las gonadotropinas); FSH (Hormona estimulante del folículo); LH (Hormona luteinizante).

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este estudio es posible concluir que:

- Durante el desarrollo prepuberal de la rata hembra, la serotonina participa en la regulación de la síntesis de las hormonas esteroides por el ovario.
- La serotonina modula la liberación de las gonadotropinas, estimulando la de FSH e inhibiendo la de LH.
- En la rata prepúber la administración de serotonina induce el proceso de muerte celular por apoptosis en el ovario de la rata, posiblemente activando la vía intrínseca, al aumentar la expresión de bax y la actividad de la caspasa 3.
- Posiblemente la serotonina regula la síntesis de hormonas esteroides al actuar directamente en el ovario, aumentando la síntesis de progesterona y disminuyendo la de testosterona y 17β -estradiol.
- El aumento en la incidencia de apoptosis y atresia folicular en los animales que fueron tratados con sulfato de serotonina esta asociado a la disminución en la concentración de 17β -estradiol, posiblemente debida a la modificación en la liberación de las gonadotropinas.

PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos en este estudio surgen algunas interrogantes, las cuales se exponen a continuación:

- ✍ ¿La serotonina puede modificar la actividad de la enzima aromatasas que transforma los andrógenos a estrógenos?
- ✍ ¿Dónde se localizan los receptores a serotonina en el ovario? ¿Qué tipo de receptores son?
- ✍ ¿Cuál es la función de la serotonina en la hipófisis? ¿Puede modificar la secreción de las gonadotropinas?
- ✍ ¿Cuál es la vía de señalización por la cual la serotonina induce la apoptosis en el ovario?

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.

Ámsterdam 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.

Antonsson B. y Martinou JC. (2000). The Bcl-2 protein family. **Exp. Cell Res.** **256**: 50-57.

Arias P., Szwarcfarb B., de Rondina DC., Carbone S., Sverdlik R. y Moguevsky JA. (1990). In vivo and in vitro studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in prepubertal and peripubertal female rats. **Brain Research** **523(1)**: 57-61.

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.

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

Barret KL., Willingham JM., Garvin AJ. Y Willingham MC. (2001). Advances in cytochemical methods for detection of apoptosis. **The journal of histochemistry & cytochemistry** **49**: 821-832.

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.

Bódis J., Török A., Hans-Rudolf T., Hanf V., Hamori M. y Cledon P. (1992). Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells. **Fertility and Sterility** **57**: 1008-1011.

Boone DL., Yan W. y Tsang BK. (1995). Identification of deoxyribonuclease 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 hematoencephalic barrier against 5-hydroxytryptamine. **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.

Carson RS., Findlay JK., Clarke IJ. y Burger HG. (1981). Estradiol, testosterone, and androstenedione in ovine follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicles. *Biology of Reproduction* 24(1): 105-113.

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.

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

Chun SY., Billig H., Tilly JL., Furuta I., Tsafiriri 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. Massachussets, E.U.A. pp. 560-565.

Dailey RA. (1999). Female Reproductive system, nonhuman mammals. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (Eds.). Academic Press. New York. pp. 229-239.

Dahlström A. y Fuxe K. (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system. I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain neurons. **Acta Physiol. Scand.** **62(Suppl.232)**: 1-55.

Depalo R, Nappi L, Loverro G, Bettocchi S, Caruso ML, Valentini AM, Selvaggi L. (2003). Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles. **Hum Reprod.** Dec; 18(12): 2678-82.

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.

Endlich K, Kuhn R, Steinhausen M. (1993). Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats. **Kidney Int.** **43(2)**: 314-323.

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

Eshkol A., Lunenfeld B. y Peters H. (1970). Ovarian development in infant mice. Dependence on gonadotrophic hormones. En: **Gonadotrophins and Ovarian Development**. Butt WR., Crooke AC. y Ryle ME. (Eds.). Londres. pp. 249-258.

Farookhi R. (1981). Atresia: An Hipótesis. En: **Dinamics of ovarian function**. NB Schwartz y M Hunzicker-Dunn (Eds). Raven Press, New Cork. pp. 13-23.

Flores A., Meléndez G., Palafox MT., Rodríguez JO., Barco AI., Chavira R., Dominguez R. y Cruz ME. (2005). The participation of the colinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. **Endocrine** **28**: 145-151.

Frago LA., Arroba A. y Chowen JA. (2001). Fundamentos de la apoptosis celular: interés en endocrinología. **Endocrinología y nutrición** **48**: 272-280.

Frazer A. y Hensler JG. (1994). Serotonin. En: **Basic neurochemistry**. GJ. Siegel, BW. Agronoff, RW. Alvers, PB. Molinogf (Eds.). Raven Press. New Cork. pp. 238-319.

Gallegos E. (2003). **Participación de la serotonina en el proceso de apoptosis durante el desarrollo prepuberal de la rata**. Tesis profesional. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

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.

Gouveia EM, Franci CR. (2004). Involvement of serotonin 5HT1 and 5HT2 receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion. **Brain Res Bull.** **63(3)**: 243-251.

Graveleau C., Paust HJ., Schmidt-Grimminger D. y Mukhopadhyay AK. (2000). Presence of a 5-HT7 receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. **J Clin Endocrinol Metab.** **85(3)**: 1277-1286.

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.

Hirshfield AN. (1985). Comparison of granulosa cell proliferation in small follicles of hypophysectomized, prepubertal, and mature rats. **Biology of reproduction** **32**: 979-987.

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

Hsu SY. y Hsueh AJW. (2000). Tissue-Specific Bcl-2 partners in apoptosis: an ovarian paradigm. **Physiological Reviews** **80**: 593-614.

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

Hussein MR. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Hum Reprod Update** **11(2)**: 162-177.

Jennes L., Beckman WC., Stumpf WE. y Grzanna R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH systems in septum and hypothalamus. **Exp. Brain. Res.** **46**: 331-338.

Jennes L., Stumpf WE. Y Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. **J Comp Neurol.** **232(4):** 534-547.

Johns MA., Azmitia EC y Krieger DT. (1982). Specific *in vitro* uptake of serotonin by cells in the anterior pituitary of the rat. **Endocrinology** **110:** 754-760.

Justo SN, Rossano GL, Szwarcfarb B, Rubio MC, Moguilevsky JA. (1989). Effect of serotonergic system on FSH secretion in male and female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions. **Neuroendocrinology** **50(4):** 382-386.

Kaipia A, Hsueh AJ. (1997). Regulation of ovarian follicle atresia. **Annu Rev Physiol.** **59:** 349-363

Kaumann AJ. y Levy FO. (2006). 5-hydroxytryptamine receptors in the human cardiovascular system. **Pharmacol Ther.** **111(3):** 674-706.

Kim J., Lee GS., Tisher CC. Y Madsen KM. (1996). Role of apoptosis in development of the ascending thin limb of the loop Henle in rat kidney. **Am. J. Physiol.** **271:** F831-F845.

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.

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.

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

Kordon C. y Glowinski J. (1972). Role of hypothalamic monoaminergic neurones in the gonadotrophin release-regulating mechanisms. **Neuropharmacology** **11(2):** 153-162.

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

Kukley M., Schaper C., Becker A., Rose K. y Kriegstein J. (2001). Effect of 5-Hidroxitryptamine 1A receptor agonist BAY X 3702 on bcl-2 and bax proteins level in

the ipsilateral cerebral cortex of rats after transient focal ischaemia. **Neuroscience** **103(3)**: 405-413.

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.

Lumpkin MD., McDonald JK., Samson WK. y McCann SM. (1989). Destruction of the dorsal anterior hypothalamic region suppresses pulsatile release of follicle stimulating hormone but not luteinizing hormona. **Neuroendocrinology** **50**: 229-235.

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 phosphatidilserine externalization. **Reproduction** **123**: 243-251.

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

Marubayashi U., Yu WH. y McCann SM. (1999). Median eminence lesions reveal separate hypothalamic control of pulsatile follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone release. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine** **220**: 139-146.

Matsuda-Minehata F, Inoue N, Goto Y, Manabe N. (2006). The regulation of ovarian granulosa cell death by pro- and anti-apoptotic molecules. **J Reprod Dev.** **52(6)**: 695-705.

McCann SM, Haens G, Mastronardi C, Walczewska A, Karanth S, Rettori V, Yu WH. (2003). The role of nitric oxide (NO) in control of LHRH release that mediates gonadotropin release and sexual behavior. **Curr Pharm Des.** **9(5)**: 381-390.

McGee EA. y Hsueh AJ. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. **Endocrine Reviews** **21(2)**: 200-214.

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.

Moguilevsky JA., Faigon MR., Scacchi P. y Szwarcfarb B. (1985). Effect of the serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats. **Neuroendocrinology** **40(2)**: 135-138.

Montagne M. y Calas A. (1988). Serotonin and endocrinology- The pituitary. En: **Neuronal Serotonin**. NN. Osborne y M.Hamon (Eds.). New York. pp. 271-304.

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 and hourglass. **Developmental Biology** **213**: 1-17.

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.

Ojeda SR. y Urbanski HF. (1994). Puberty in the rat. En: **The physiology of reproduction**. 2a. edición. E. Knobil y JD. Neill (Eds). Raven Press. New York, USA. pp. 363-409

Oliver RH., Chen GD. y Yeh J. (1999). Follicular atresia. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (Eds.). Academic Press. New York. pp. 373-375.

Pakala R., Willerson JT. Y Benedict CR. (1997). Effect of serotonin, thromboxane A2, and specific receptor antagonists on vascular smooth muscle cell proliferation. **Circulation** **96**: 2280-2286.

Peitsch M., Poizar B., Stephan H., Crompton T., Mac Donald HR., Mannherg 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.

Peters H. (1979). Some aspects of early follicular development. En: **Ovarian Follicular Development and Function**. Midgley AR. y Sadler WA. (Eds.). New York. pp. 1-13.

Pinilla L, Aguilar E, Guisado R, Gonzalez D, Lopez F. (1999). Relation between body weight, growth rate, chronological age and puberty in male and female rats. **Rev Esp Fisiol.** **40(1)**: 83-86.

- Pinilla L., González LC. Tena-Sempere M. y Aguilar E. (2003). 5-HT₁ and 5-HT₂ receptor activation reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-stimulated LH secretion in prepubertal male and female rats. **European Journal of Endocrinology** **148**: 121-127.
- Pires J., Curi R., Otton R. (2007). Induction of apoptosis in rat lymphocytes by starvation. **Clin Sci (Lond)** **112(1)**: 59-67.
- Ramaley JA. (1979). Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. **Biology of reproduction** **20**: 1-31.
- Ramírez VD. (1973). Endocrinology of puberty. En: **Handbook of Physiology. Vol. II Sec. 7**. RO. Greep y EB. Astwood (Eds). Washington, USA. pp. 1-28.
- Roche JF. (1996). Control and regulation of folliculogénesis – a symposium in perspectiva. **Reviews of Reproduction** **1**: 19-27.
- Ross MH., Lynn JR. y Gordon IK. (1997). **HISTOLOGÍA Texto y Atlas**. 3ra edición. Editorial Médica Panamericana. México, D.F. 87, 224-228.
- Ryan RJ. (1981). Follicular atresia: Some speculations of biochemical markers and mechanisms. En: **Dinamics of ovarian function**. NB Schwartz y M Hunzicker-Dunn (Eds). Raven Press, New Cork. pp. 1-11.
- Schaeffer HJ. y Sirotkin AV. (1997). Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. **Exp Clin Endocrinol Diabetes** **105(2)**: 109-112.
- 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.
- Schwartz NB. (1974). The role of FSH and LH and of their antibodies on follicular growth and on ovulation. **Biol. Reprod.** **10**: 236-272.
- Sirotkin AV. Y Schaeffer H-J. (1997). Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. **Journal of Endocrinology.** **154**: 1-5.
- 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 KI., 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., Tilly KI., Kenton ML. y Johnson AL. (1995). Expresión of members of the Bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and Bcl-x_{long} messenger ribonucleic acid levels. **Endocrinology** **136**: 232-241.
- Tilly JL. (1996). Apoptosis and ovarian function. **Reviews in Reproduction** **1(3)**:162-172.
- Van Voorhis BJ. (1999). Follicular development. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (Eds.). Academic Press. New York. pp. 376-389.
- Verbeke M, Smollich B, van de Voorde J, de Ridder L, Lameire N. (1996). Beneficial influence of ketanserin on autoregulation of blood flow in post-ischemic kidneys. **J Am Soc Nephrol.** **7(4)**: 621-627.
- Veselá J., Reháč P., Mihalik J., Czikkova S., Pokorný J. y Koppel J. (2003). Expresión of serotonin receptors in Mouse oocytes and preimplantation embryos. **Physiol. Res.** **52**: 223-228.
- Vitale ML., Parisi MN., Chiocchio SR. y Tramezzani JH. (1986). Serotonin induces gonadotrophin release through stimulation of LH-releasing hormone release from the median eminence. **Journal of Endocrinology** **111**: 309-315.
- Westlund KN. y Childs GV. (1982). Localization of serotonin fibers in the rat adenohypophysis. **Endocrinology** **111**: 1761-1763.
- Whitaker-Azmitia PM. (2001). Serotonina and brain development: Role in human developmental diseases. **Brain Research Bulletin** **56**: 479-485.

Wilson CA., McNeilly AS y Yeo MT. (1986) Mechanisms by which 5-HT stimulates ovulation in the immature rat treated with mare serum gonadotrophin. **Acta endocrinologica**, **111**: 235-240.

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

Yie SM., Niles LP. y Younglai EV. (1995). Melatonin receptors on human granulosa cell membranes. **J Clin Endocrinol Metab** **80(5)**: 1747-1749.

Ying S-Y. y Zhang Z.. (1999). Ovarian Hormones, Overview. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (Eds.). Academic Press. New York. pp. 578-582.

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

APÉNDICE A

Para realizar la cuantificación de hormonas esteroides se preparó una curva patron, la cual se hizo por duplicado, para cada hormona con las concentraciones siguientes:

- En la curva patrón para progesterona se utilizaron calibradores de 0.1, 0.5, 2.0, 10, 20 y 40 ng/ml.
- En la curva patrón para testosterona se utilizaron calibradores de 0.0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0, 8.0 y 16.0 ng/ml.
- En la curva patrón para 17 β -estradiol se utilizaron calibradores de 0.0, 10, 20, 50, 150, 250, 500 y 900 pg/ml.

APÉNDICE B

Los ovarios almacenados a -70°C se homogenizaron con 500 μ l de Trizol (TRIZOL® Reagent) (Invitrogen) en un politron y se incubaron en hielo por 5 minutos. Enseguida se agregaron 200 μ l de cloroformo, se agitaron por 15 segundos y se incubaron en hielo durante 3 minutos. Las muestras se centrifugaron a 12000 rpm por 15 minutos y se colectó el sobrenadante en tubos ependorff de 1.5 ml y se les agregaron 500 μ l de isopropanol y se dejó precipitar el RNA durante un día a -20°C. Se centrifugo a 12000 rpm por 10 minutos y se decanto el sobrenadante, se agregaron 500 μ l de etanol al 75% en agua con DEPC, se agito con el vortex hasta despegar el botón y se centrifugo a 7500 rpm por 5 minutos se decanto el sobrenadante y se resuspendió el RNA en 50 μ l de agua con DEPC. El RNA se almaceno a -70°C para posteriormente realizar la RT.

APÉNDICE C

Ovarios almacenados a -70°C fueron homogenizados con 100 μ l de buffer de lisis y posteriormente centrifugados a 14000 rpm durante 15 min y se colecto el

sobrenadante en tubos ependorff nuevos. Las reacciones se prepararon de acuerdo a la siguiente tabla:

	Lisado de ovario	Caspasa 3 5µg/ml	Buffer de ensayo	Inhibidor de caspasa 2mM	Substrato de caspasa 3 20mM
Blanco	-		490µl		10µl
T.A.	10µl		480µl		10µl
T.A. + Inhibidor	10µl		470µl	10µl	10µl
5-HT	10µl		480µl		10µl
5-HT + inhibidor	10µl		470µl	10µl	10µl
Control positivo para caspasa 3		10µl	480µl		10µl
Control positivo para caspasa 3 + inhibidor		10µl	470µl	10µl	10µl

Las reacciones se incubaron durante 3 horas y media a 37°C en un baño de aceite y posteriormente se midió la absorbancia a 405 nm.

Buffer de lisis: 250 mM HEPES, pH 7.4, 25 mM CHAPS, 25 mM DTT.

Buffer de ensayo: 200 mM HEPES, pH 7.4, 1% CHAPS, 50 mM DTT, 20 mM EDTA.