



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTAGONISTAS DE LOS
RECEPTORES A SEROTONINA DEL TIPO 5-HT_{2A} Y 5-HT_{2C} EN LA
BURSA DEL OVARIO EN LA SECRECIÓN DE PROGESTERONA,
TESTOSTERONA Y ESTRADIOL**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

B I Ó L O G O

P R E S E N T A:

JESSICA ROMERO REYES

DIRECTORA: Dra. María Elena Ayala Escobar



MÉXICO, D.F.

ENERO, 2009.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE ANTAGONISTAS DE LOS
RECEPTORES A SEROTONINA DEL TIPO 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} EN LA BURSA DEL
OVARIO EN LA SECRECIÓN DE PROGESTERONA, TESTOSTERONA Y
ESTRADIOL

Tesis que para obtener el título de biólogo presenta: Jessica Romero Reyes.

Directora de Tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar.

Realizada en el Laboratorio de Pubertad de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DAGAPA-PAPIIT Convenio IN219408.

Agradecimientos:

Especialmente a la Dra. María Elena Ayala Escobar por todo el apoyo brindado para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar.

Dr. Roberto Domínguez Casalá.

Dra. Leticia Morales Ledesma.

Dra. Patricia Rosas Saucedo.

M. en BRA. M^a Judith Villavicencio Macias.

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

A Eloir, Daniel, Juanita, Diana, Juan Luis, Julio, Omar, Maritza y Andrea por compartir sus historias conmigo.

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

Dedicatorias:

A Andrés, gracias a ti por que siempre me acompañas, me diste grandes lecciones que me estimularon a continuar a pesar de lo doloroso que en ocasiones me pudiera parecer la vida, gracias papá, como te lo prometí, aquí esta... este es un paso más.

A Ana María, mi madre, una mujer admirable que tuvo el valor y la fuerza para sacar adelante a mis hermanos y a mí.

A mi abue María Concepción, quien siempre ha estado conmigo, quien me ha cuidado y ha luchado para juntos salir adelante.

A mis hermanos Jazmín y Jorge, por que sabemos que siempre nos tendremos el uno al otro.

A mi sobrinita Ariel Belldandy, alegría y luz en mi camino.

A mi BP por tu paciencia y comprensión pero sobre todo por tu amor.

A mis amigos Jaqueline, Abraham, José Daniel, Ernesto y José Francisco, por todos los momentos que hemos pasado juntos y las locuras que compartimos.

A Eloir, Juanita, Diana, Juan Luis y Julio, por lo importante que es para mi el que hayan compartido sus conocimientos conmigo.

ÍNDICE

Resumen.....	I
Introducción.....	1
Serotonina.....	1
Ovario.....	4
Esteroidogénesis.....	9
Serotonina y Ovario.....	14
Planteamiento del Problema.....	18
Hipótesis.....	19
Objetivo General.....	20
Objetivos Particulares.....	20
Materiales y Métodos.....	21
Animales, Tratamiento y Fármacos.....	21
Procedimiento de Administración de Fármacos en Bursa del Ovario.....	21
Procedimiento de Autopsia.....	21
Cuantificación de Hormonas Esteroides.....	22
Cuantificación de Serotonina y Catecolaminas.....	22

Análisis Estadístico de Resultados.....	24
Resultados.....	25
<i>Efectos de la Administración de Sulfato de Serotonina vía Sistémica.....</i>	<i>25</i>
Concentración de Catecolaminas y Serotonina.....	25
Concentración de Hormonas Esteroides.....	26
<i>Efectos de la Administración de Ketanserina o Metisergide en Bursa del Ovario.....</i>	<i>30</i>
Concentración de Catecolaminas y Serotonina.....	30
Concentración de Hormonas Esteroides.....	31
<i>Efectos de la Administración de Ketanserina o Metisergide en Bursa del Ovario más Sulfato de Serotonina vía Sistémica.....</i>	<i>34</i>
Concentración de Catecolaminas y Serotonina.....	34
Concentración de Hormonas Esteroides.....	35
Discusión.....	44
Conclusiones.....	53
Perspectivas.....	54
Bibliografía.....	55

Apéndices..... 65

RESUMEN

La serotonina participa en la regulación de las funciones del ovario. Por estudios farmacológicos se sugiere que en el ovario de la rata existen receptores a esta amina del tipo 5-HT₁, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} y hasta el presente se desconoce si la serotonina actúa directamente en el ovario modulando la esteroidogénesis. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de dos antagonistas a serotonina: ketanserina (bloqueador del receptor 5-HT_{2A}) y metisergide (bloqueador de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) directamente en la bursa del ovario sobre la secreción de progesterona, testosterona y estradiol en la rata prepúber.

En comparación con los animales testigo absoluto, a los que se les administro sulfato de serotonina por vía sistémica y se sacrificaron a las 24 horas, la concentración de serotonina fue mayor en hipófisis (0.38 ± 0.10 vs. 0.77 ± 0.13 ng/mg de tejido, $p < 0.05$), y los ovarios de los animales sacrificados a las 48 horas (0.41 ± 0.06 vs. 1.73 ± 0.39 ng/mg de tejido, $p < 0.05$). En cambio, la concentración de progesterona fue menor en el suero de los animales sacrificados a las 24 horas postratamiento (16.45 ± 1.83 vs. 9.9 ± 1.5 ng/ml de suero, $p < 0.05$) y de estradiol en los animales sacrificados a las 48 horas.

En relación con el grupo testigo absoluto, en los animales a los que se les inyectó ketanserina en bursa sacrificados a las 24 horas la concentración de serotonina en ovario (1.12 ± 0.23 vs. 0.25 ± 0.04 ng/mg de tejido, $p < 0.05$) y de progesterona (16.45 ± 1.83 vs. 10.45 ± 1.15 ng/ml de suero, $p < 0.05$) en suero fue menor y la de estradiol en los animales sacrificados a las 24 (19.05 ± 1.15 vs. 14.18 ± 1.43 pg/ml de suero, $p < 0.05$) ó 48 horas (26.06 ± 4.11 vs. 11.73 ± 1.00 pg/ml de suero, $p < 0.05$). Cuando a los animales se les administró metisergide en bursa y se sacrificaron 24 horas después no se modificó la concentración de serotonina en ovario, y en suero la de progesterona fue menor (16.45 ± 1.83 vs. 9.75 ± 1.16 pg/ml de suero, $p < 0.05$).

En comparación al grupo de animales que recibió sulfato de serotonina por vía sistémica, en los ovarios de los tratados con ketanserina en bursa y sulfato de serotonina por vía sistémica sacrificados a las 24 horas, la concentración de serotonina en el ovario fue menor (1.45 ± 0.21 vs. 0.90 ± 0.12 ng/mg de tejido, $p < 0.05$), así como la de progesterona en el suero a las 24 (9.90 ± 1.45 vs. 4.03 ± 1.11 ng/ml de suero, $p < 0.05$) ó 48 horas (8.31 ± 1.45 vs. 0.79 ± 0.25 ng/ml de suero, $p < 0.05$). Este mismo comportamiento se observó en la concentración de estradiol en los animales sacrificados a las 48 horas (18.20 ± 2.33 vs. 12.17 ± 0.80 pg/ml de suero, $p < 0.05$). Lo mismo se observó en la concentración de progesterona en el suero de los animales que recibieron metisergide en bursa y sulfato de serotonina sacrificados 24 horas después del tratamiento (9.90 ± 1.45 vs. 3.70 ± 0.79 ng/ml de suero, $p < 0.05$).

Con base en los resultados obtenidos en este estudio es posible sugerir que la serotonina actúa directamente en el ovario del animal prepúber en la modulación de la secreción de progesterona y estradiol al interactuar con sus receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}.

INTRODUCCIÓN

Serotonina

En 1937 se observó que una sustancia secretada por las células enterocromafines del intestino causaba la contracción del músculo liso del útero de la rata (Erspamer y Vialli, 1937). En 1948, a partir del suero de vaca se aisló, purificó e identificó a esta sustancia como serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) (Rapport y col., 1948). Posteriormente se identificó a la 5-HT en las plaquetas, así como en el sistema nervioso central en donde actúa como neurotransmisor (Rang y col., 2004).

La serotonina es una amina que se sintetiza a partir del aminoácido L-triptófano, presente en la dieta. Este aminoácido se transforma en 5-hidroxitriptófano por medio de la enzima triptófano hidroxilasa y por acción de la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa da origen a la 5HT. En tejidos periféricos las células enterocromafines producen el 95% de la serotonina. La degradación de esta amina se lleva a cabo mediante la monoaminoxidasa (MAO-A) y la aldehído deshidrogenasa que transforman a la serotonina en el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Fig. 1) (Finberg y Youdim, 1983; Rang y col., 2004).

En el sistema nervioso central la serotonina se sintetiza en neuronas del núcleo del rafe. Para su estudio el núcleo se divide en dorsal, medial y del puente. Las fibras que se origina en el rafe dorsal y medial envían sus proyecciones a la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, los ganglios basales, el hipotálamo y otras estructuras. Las fibras que se originan en el núcleo del puente inervan el cerebelo, puente y la médula espinal. Otras regiones del encéfalo donde se lleva a cabo la síntesis de esta amina son el hipotálamo y la glándula pineal (Rang y col., 2004; von Bohlen y Dermietzel, 2006; Linder y col., 2007).

Las fibras serotoninérgicas que se originan en los núcleos dorsal y medial también inervan la hipófisis. La estimulación eléctrica del núcleo medial y dorsal del rafe en ratas macho incrementa la concentración de 5-hidroxitriptófano (5-HTP)

en el lóbulo intermedio y la neurohipófisis, por lo que se sugiere que en las fibras serotoninérgicas que inervan esta glándula se produce la síntesis de serotonina (Shannon y Moore, 1987^{a, b}).

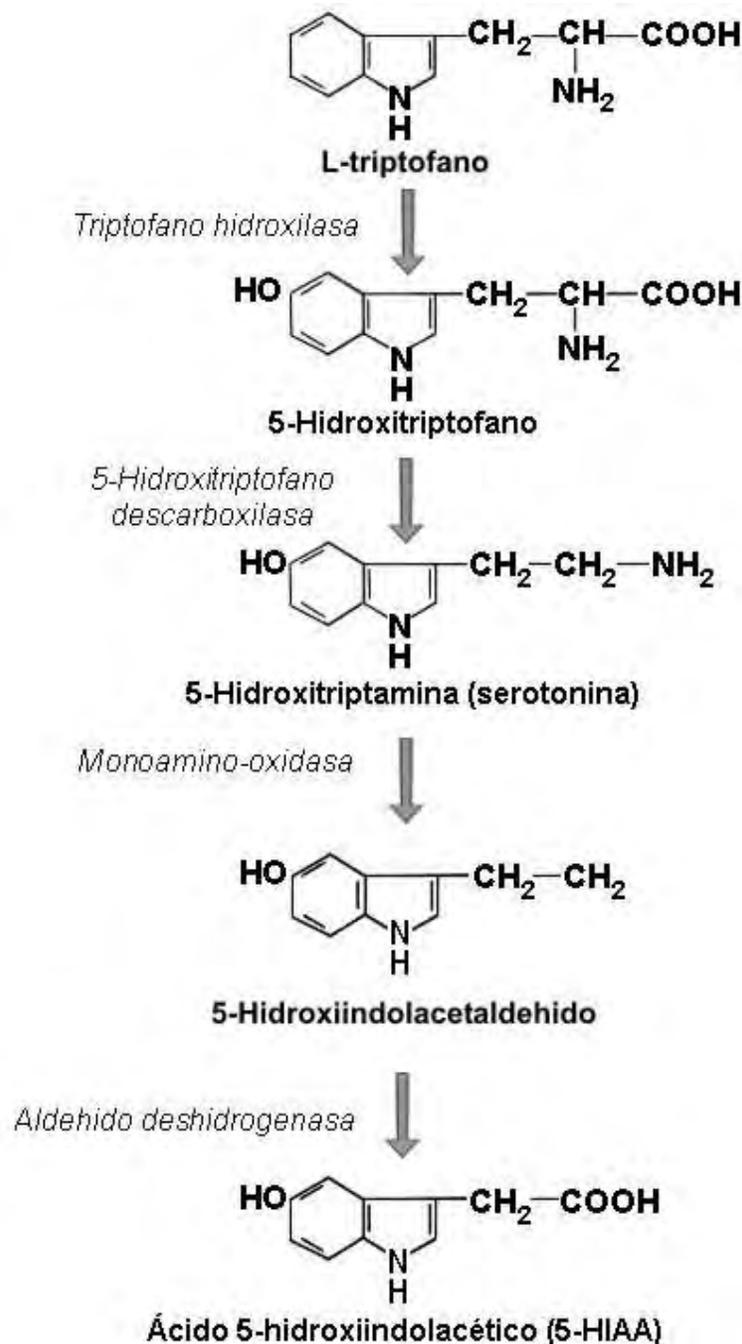


Figura 1. Síntesis y degradación de la serotonina (Modificado de Goldman y Ausiello, 2008).

A la serotonina también se le encuentra en los órganos del aparato reproductor de la hembra (Cuadro 1) (Dubé y Amireault, 2007).

La acción de la serotonina en sus órganos o tejidos blanco es mediada por diferentes tipos de receptores. En los mamíferos se ha mostrado que existen siete clases de receptores, que se identifican como 5-HT₁ al 5-HT₇, los que a su vez se dividen en subgrupos A, B, C o D (Dubé y Amireault, 2007) y están acoplados a proteínas G con excepción del 5-HT₃, el cual se encuentra acoplado a un canal iónico (Rang y col., 2004).

Cuadro1. Componentes del sistema serotoninérgico en el aparato reproductor de la hembra de los mamíferos (Modificado de Dubé y Amireault, 2007).

Componente del Sistema Serotoninérgico	Especie	Células / Tejidos
5-HT	Humano	Fluido folicular
	Rata	Ovario, útero, oviductos, placenta
	Ratón	Ovocito, células del cumulus, embriones
Receptores 5-HT		
5-HT₇	Humano	Células de la granulosa
	Ratón	Ovocito, células del cumulus, embriones
5-HT_{1D}	Ratón	Ovocito, embriones
5-HT_{2A}	Humano	Ovocito
	Ratón	Células del cumulus
5-HT_{2B}	Ratón	Células del cumulus
5-HT_{2C}	Hámster	Células de ovario de hámster chino (Porter y col., 1999)
5-HT_{5A}	Ratón	Ovocito
Triptófano hidroxilasa-1 (TPH1)	Ratón	Células del cumulus
Proteína transportadora de la serotonina (SERT)	Ratón	Ovocito, células del cumulus
	Hámster	Embriones

Dependiendo del tipo de proteína G al que se acopla el receptor de serotonina es la respuesta intracelular. Así, los receptores 5-HT₁ acoplados a proteínas G del tipo inhibitorio (G_{i/o}) inhiben a la enzima adenilato ciclasa y como consecuencia disminuyen la síntesis del adenosin monofosfato cíclico (AMPc) a partir del adenosin trifosfato (ATP). El estímulo de los receptores 5-HT₂ acoplados a proteínas G_q, se traduce en un incremento en la formación de fosfolipasa C y como resultado aumenta la concentración de calcio (Ca²⁺) intracelular (Barnes y Sharp, 1999; Fink y Göthert, 2007). Mientras que, los receptores 5-HT₄, 5-HT₆ y 5-HT₇ acoplados a proteínas G_s, cuando se activan favorecen la formación de adenilato ciclasa y del AMPc (Graveleau y col., 2000).

La serotonina modula diversas funciones tales como alimentación, motilidad intestinal, estado de ánimo, sueño, vasodilatación, vasoconstricción, comportamiento sexual (Vega Matuszcyk y col., 1998; Rang y col., 2004; Frassetto y col., 2008), la actividad de otros sistemas de neurotransmisión como la dopamina y norepinefrina, (Oades y Halliday, 1987; Chen y Reith, 1995), la secreción de factores liberadores por el hipotálamo y de hormonas por la hipófisis (Vitale y col., 1986; Justo y col., 1989), los ovarios, testículos y glándula adrenal (Tanaka y col., 1993; Gallegos, 2007).

Ovario

El ovario libera ovocitos capaces de ser fecundados y secreta hormonas protéicas (inhibina y activina) (Findlay y col., 2000), esteroides (progesterona, testosterona y estradiol), factores de crecimiento como el factor de crecimiento parecido a la insulina I (IGF-I) y II (IGF-II) y el factor de crecimiento epidérmico (EGF) entre otros (Sirotkin y col., 1998).

El ovario está rodeado por la bursa ovárica, la cual esta compuesta por tres capas, la interna que es un epitelio discontinuo que da hacia el ovario, la media

formada por tejido conectivo que contiene fibroblastos, células musculares lisas y vasos sanguíneos y la externa que es un epitelio continuo que da hacia la cavidad peritoneal.

la cavidad que se forma entre esta y el ovario se encuentra llena de fluido y se denomina cavidad bursal (Beck, 1972; Martin y col., 1981).

La bursa ovárica tiene un papel importante en la ovulación y reproducción en los roedores, ya que el fluido que se encuentra en esta cavidad provee al ovocito de un microambiente hormonal. Por otro lado la bursa mantiene a los ovocitos en la cavidad bursal impidiendo que salgan a la cavidad abdominal, esto permite que los ovocitos se dirijan hacia el oviducto (Beck, 1972; Li y col., 2007). Se ha mostrado en los ovarios de rata que cuando la bursa es removida, la cantidad de ovocitos que se encuentran en el oviducto es menor en relación a la cantidad que hay cuando está presente (Vanderhyden y col., 1986 citados en Li y col., 2007).

En el ovario se distinguen dos regiones (Fig. 2), la interna o médula compuesta por tejido conjuntivo laxo que contiene vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas que ingresan y salen por el hilio. La región externa o corteza, formada por tejido conectivo y en ella se encuentran los folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo (primordiales, primarios, secundarios o antrales y maduros o de De Graaf (Geneser, 2000; Yen y col., 2001) (Fig. 3).



Figura 2. Estructura del ovario donde se muestran diferentes tipos de folículos en crecimiento (Modificado de Kronenberg y col., 2008).

Las diferentes etapas del desarrollo folicular se caracterizan por cambios en la morfología y tamaño del ovocito, el número de capas de células de la granulosa así como su organización (Greenwald y Terranova, 1988). Los folículos primordiales están constituidos por el ovocito y una capa de células de forma aplanada que lo rodean, las células foliculares. Durante la maduración del folículo primordial y su transformación en el folículo primario, el ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares que le rodean crecen, adquieren una forma cúbica y

posteriormente cilíndrica y a estas células se les denominan células de la granulosa (Geneser, 2000).

En el folículo primario, las células que rodean al ovocito se multiplican y forman el folículo secundario o antral que se caracteriza porque diferentes capas de células de la granulosa rodean al ovocito. En este tipo de folículo, entre las células de la granulosa aparecen cavidades de forma irregular llenas de líquido que al fusionarse constituyen el antro folicular. La multiplicación de las células de la granulosa es estimulada por los estrógenos y la hormona estimulante del folículo (FSH) (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Conforme el folículo se desarrolla, el ovocito adquiere una posición excéntrica y está rodeado por diferentes capas de células de la granulosa que forman al *cumulus ooforus*. Las células de la teca folicular se diferencian y forman las células de la teca interna y teca externa, a esta última capa ingresan vasos sanguíneos (Geneser, 2000; Yen y col., 2001; Ross y col., 2004).

Es posible distinguir tres grupos de células de la granulosa, la mural, antral y del complejo del cúmulus. Las células de la granulosa del grupo mural y antral están separadas de la teca por una membrana basal (Yen y col., 2001). Las células murales tienen mayor capacidad de sintetizar hormonas esteroideas, ya que poseen una concentración elevada de 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y citocromo P450 que son enzimas esenciales en la transformación de andrógenos a estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Algunos de los factores que estimulan la diferenciación de las células de la teca son el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF)-I o el II, el de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9), el de células troncales (SCF) y la folistatina (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Ojeda y Urbanski, 1988; Magoffin, 2005). En las células de la teca interna se expresan los receptores a hormona luteinizante (LH), la expresión de estos receptores es inducida por los estrógenos y algunos factores que estimulan la acción de la LH como son el IGF-I, la inhibina, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el GDF-9. La LH al actuar en células de la teca

estimula la síntesis y secreción de los andrógenos. Además de la LH, la síntesis de andrógenos es regulada por el factor de crecimiento transformador β (TGF- β) y la activina que son producidas por las células de la granulosa (Geneser, 2000; Yen y col., 2000; Magoffin, 2005).

Al folículo maduro o de De Graaf lo constituye el ovocito rodeado por la zona pelúcida formada de glucoproteínas, células de la granulosa y por la lámina basal que rodea a estas y las separa de las células de la teca. Los vasos sanguíneos y linfáticos irrigan a la teca y no llegan a la capa granulosa (Yen y col., 2001). Previo a la ovulación aumenta el tamaño del folículo y se desprenden las células de la sección basal del *cumulus ooforus*, lo que permite que el ovocito flote en el líquido folicular rodeado células de la granulosa orientadas radialmente por lo que reciben el nombre de corona radiada (Eppig y col., 1996; Geneser, 2000).

En las células de la granulosa la FSH al unirse a sus receptores estimula el desarrollo y proliferación de estas células, así como la síntesis de los estrógenos (Geneser, 2000; Ross y col., 2004). Además de la FSH, la PRL estimula el desarrollo del folículo maduro o de De Graaf, la expresión de los receptores a esta hormona en células de la granulosa es inducida por la FSH (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Después de la ovulación, la PRL inicia la luteinización de las células de la granulosa y mantiene la secreción de progesterona por parte de las células luteales, e inhibe la enzima 20α -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que transforma a la progesterona en 20α -hidroxiprogestero, la cual es un metabolito biológicamente inactivo de esta hormona. Con base en esto se sugiere que la PRL mantiene la estructura y función del cuerpo lúteo (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Freeman y col., 2000).

La mayoría de los folículos que inician su desarrollo no lo completan y presentan un proceso de degeneración que se denomina, atresia folicular. Durante

este proceso se presentan diferentes cambios morfológicos y bioquímicos que conducen a la degeneración del folículo (Greenwald y Terranova, 1988). Entre los cambios morfológicos se encuentra la disminución en la mitosis de las células de la granulosa, picnosis de las células de la granulosa, infiltración de leucocitos entre las células de la granulosa, fragmentación de la membrana basal, hipertrofia de las células de la teca y alteración del ovocito (Yen y col., 2001). Los cambios bioquímicos generados durante este proceso son: la disminución en la actividad de la enzima 17α -hidroxilasa y aromatasa, lo que disminuye la concentración de estrógenos y favorece la acumulación de andrógenos, disminución en la expresión de receptores a gonadotropinas y como consecuencia insensibilidad a la LH y FSH (Hsueh y col., 1994; Kaipia y Hsueh, 1997).

Esteroidogénesis

La síntesis de estrógenos en el ovario se lleva a cabo con la participación conjunta de las células de la teca y las células de la granulosa (Fig. 4). El precursor para la síntesis de estas hormonas es el colesterol que se sintetiza en la misma célula folicular a partir del Acetil-CoA. Otra fuente de colesterol son las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se encuentran en sangre y mediante un proceso de endocitosis se incorporan al citoplasma de la célula (Gore-Langton y Armstrong, 1988). El colesterol es transportado al interior de la mitocondria por la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR) (Drucker, 2005; Magoffin, 2005).

En las células de la teca interna la LH se une a sus receptores acoplados a proteínas G y activa la adenilato ciclasa, que estimula la conversión de ATP en AMPc (Fig. 4), éste actúa como segundo mensajero y estimula una cascada de señalización que culmina con la activación de diferentes complejos enzimáticos entre ellos, la enzima P450_{scc} que es la responsable de transformar el colesterol en pregnenolona en la mitocondria (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

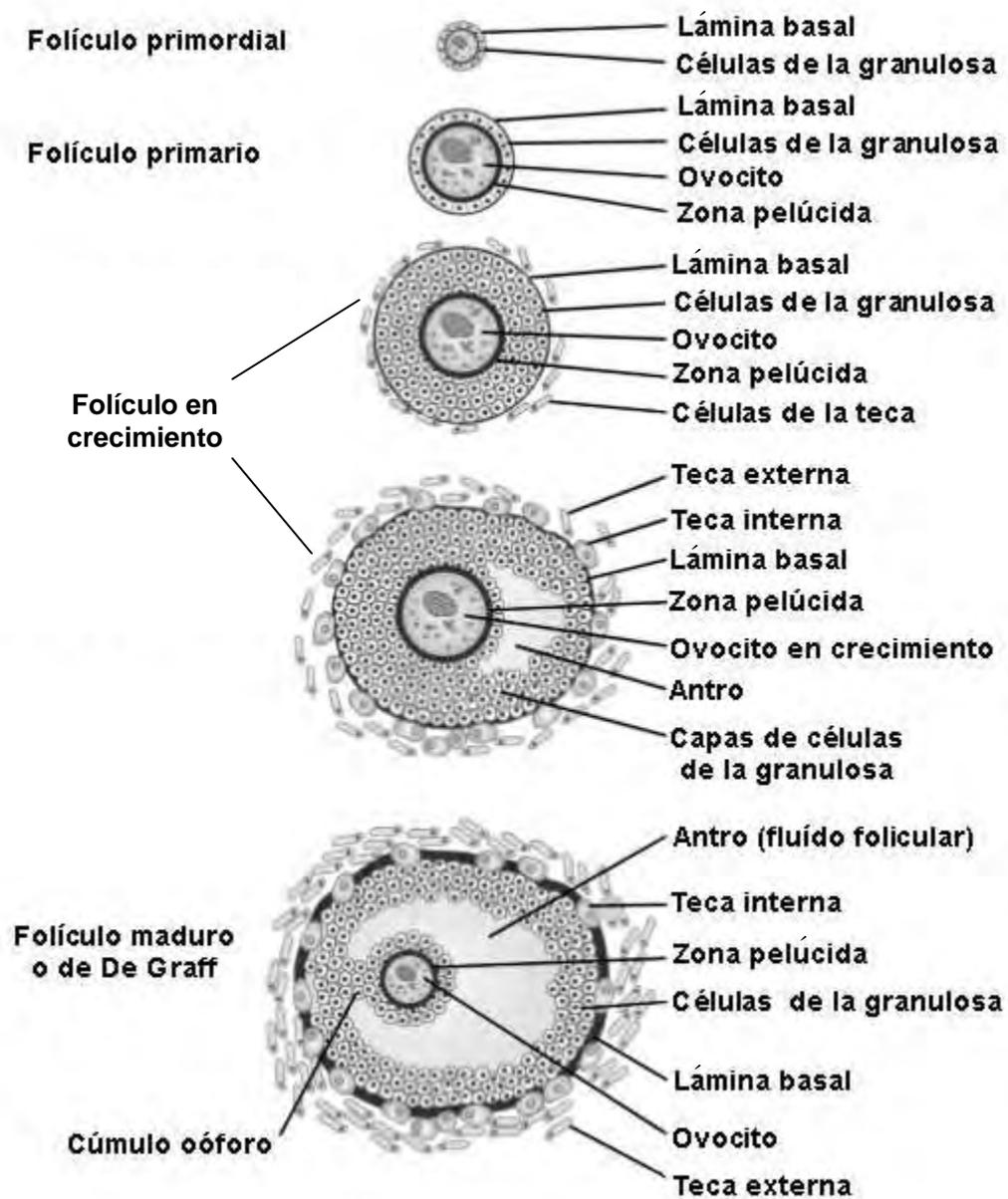


Figura 3. Esquema de la estructura de los diferentes tipos de folículos ováricos (Modificado de Kronenberg y col., 2008).

La síntesis de esteroides sexuales se lleva a cabo por 2 vías una de ellas es la $\Delta 4$ donde la pregnenolona mediante la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) es transformada en esteroides como la progesterona, 17-OH progesterona, y andrógenos como la andostenediona y testosterona. Mientras que, en la ruta $\Delta 5$ el esteroide sintetizado es la 17-OH pregnenolona y los andrógenos, dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Los andrógenos se difunden a través de la membrana basal hacia las células de la granulosa, donde la FSH y la LH estimulan la formación de AMPc que activa a la enzima aromatasa (Wickings y col., 1986) responsable de la transformación de los andrógenos a estrógenos. En la ruta $\Delta 4$ el estrógeno que se sintetiza es la estrona y en la $\Delta 5$ el estradiol (Fig. 5) los estrógenos secretados por las células de la granulosa actúan en las mismas estimulando su proliferación o pasan a la circulación y son transportados a sus órganos blanco (Murray y col., 1994, 2007).

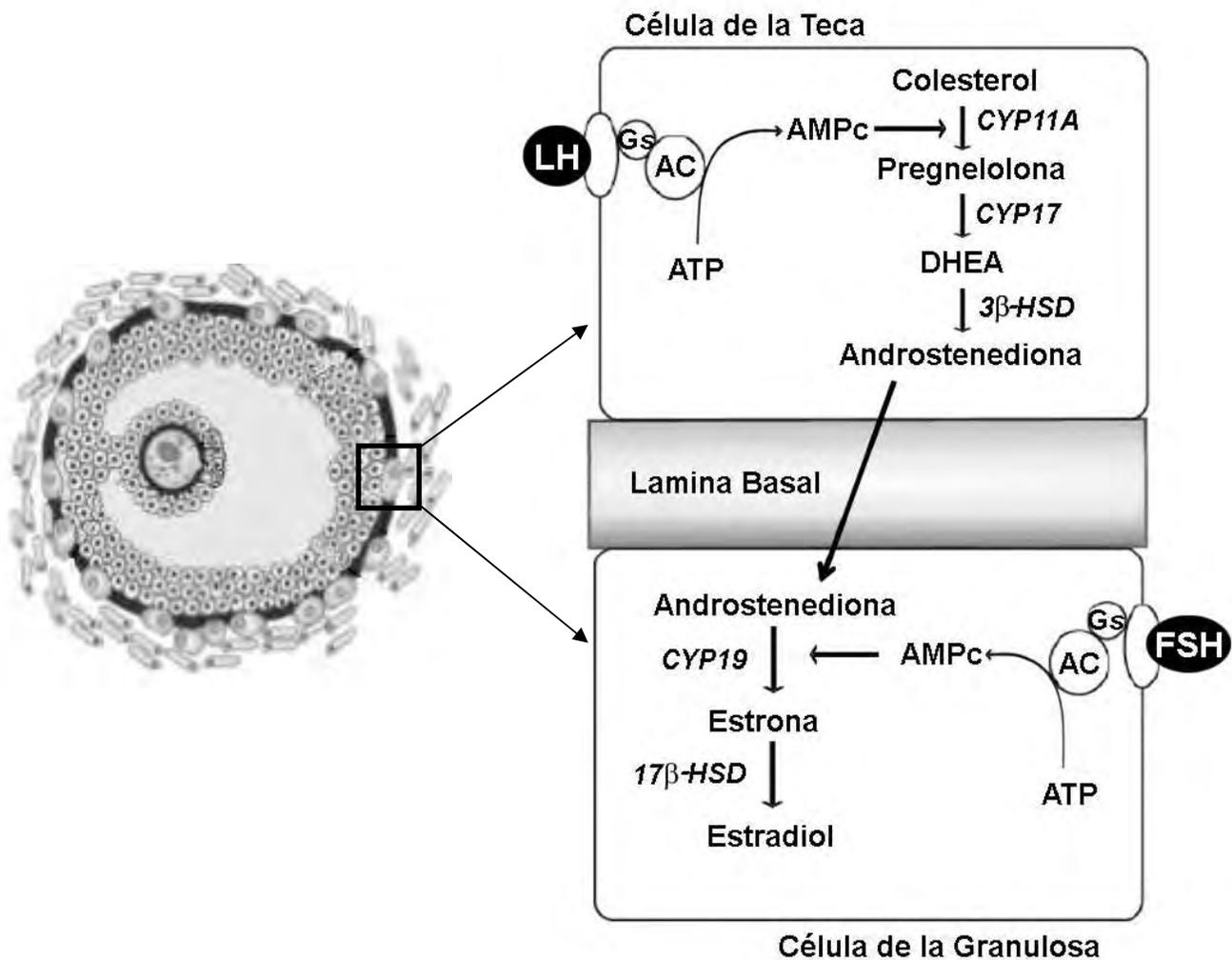


Figura 4. Síntesis de hormonas esteroideas en el folículo: P450_{ssc} (CYP11A), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), 17α-hidroxiesteroide deshidrogenasa/17,20-liasa; Citocromo P450 (CYP17); Citocromo P450 aromatasa (CYP19); 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD) (Modificado de Magoffin., 2005).

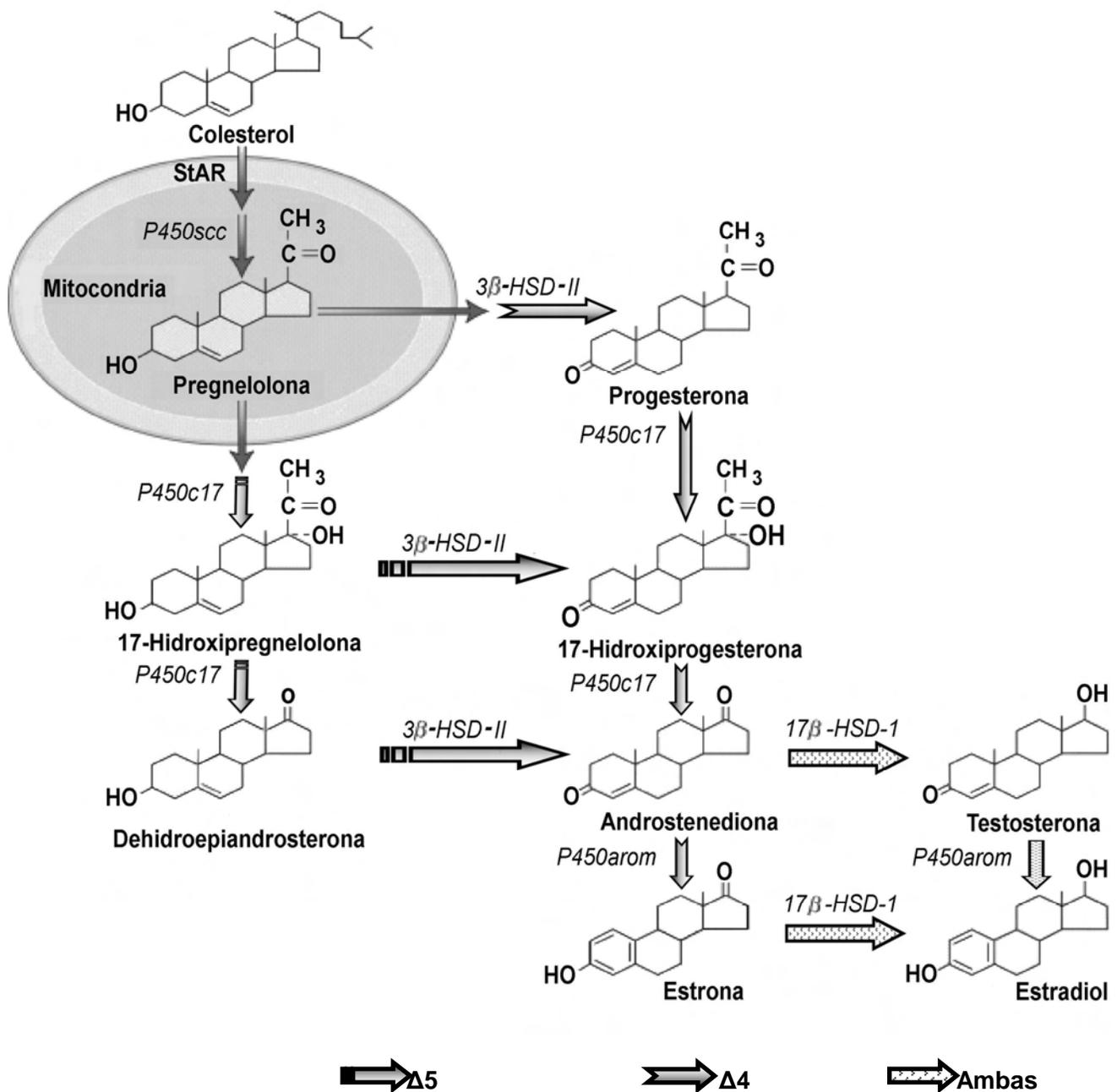


Figura 5. Biosíntesis de hormonas esteroideas en el ovario: 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo II (3β -HSD-II) y $\Delta^{4,5}$ isomerasa; 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1 (17β -HSD-1); P450scc (20,22-Desmolasa), P450arom (aromatasa); P450c17, (17α -hidroxilasa/ $17,20$ -liasa); proteína reguladora esteroideogénica (StAR) (Modificado de Kronenberg y col., 2008).

Serotonina y Ovario

Las funciones del ovario, ovulación y esteroidogénesis, son reguladas por diferentes factores: gonadotropinas, IGF-I, hormona del crecimiento (GH), oxitocina, aminas biogénicas como la serotonina entre otras, y por la inervación que recibe el órgano (Donoso y col., 1971; Ricu y col., 2008). Los factores de crecimiento además de estimular la proliferación de las células de la granulosa, estimulan la expresión de los receptores a la FSH y en la teca los receptores a LH (Schaeffer y Sirotkin, 1997; Sirotkin y col., 1998).

La participación de la serotonina en la modulación de las funciones del ovario y en particular de la esteroidogénesis, se haría por sus efectos moduladores de la secreción de las gonadotropinas y como consecuencia la producción de andrógenos y estrógenos por el ovario (Justo y col., 1989; Tanaka y col., 1993; Vitale y Chiocchio, 1993; Díaz y col., 1997; Gallegos, 2007).

Por estudios de inmunohistoquímica se muestra que en el hipotálamo existe una comunicación entre el soma de las neuronas que producen la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y la terminal de las que producen la serotonina o entre las terminales de ambas células. Estas evidencias anatómicas apoyan la idea de que la serotonina modula la producción de las gonadotropinas vía la secreción de la GnRH (Smith y Jennes, 2001).

Justo y col. (1989) mostraron que cuando a la ratas hembra prepúberes se le inyecta intraperitonealmente el 5-hidroxitriptofano, precursor de la síntesis de serotonina, se incrementa la concentración de serotonina y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolácetico (5-HIAA) en el hipotálamo y la de LH en suero. Aguilar y col. (1993) observaron que cuando se administra este precursor por la misma vía a ratas hembra, de 16 días de edad, hay mayor concentración de LH y FSH en el suero de los animales tratados. Cuando este mismo tratamiento lo aplica a ratas macho, solo se incrementa la FSH. Estos resultados llevaron a los autores a concluir que la

serotonina modula la secreción de las gonadotropinas y que sus efectos son diferentes en la hembra y el macho.

Es probable que las diferencias observadas en la participación de la serotonina en la regulación de la secreción de gonadotropinas en los diferentes modelos sea el resultado de que en dichos experimentos no se toma en cuenta la edad y en consecuencia el ambiente hormonal del animal. Las diferencias observadas en la participación del sistema serotoninérgico entre machos y hembras es posible que esté asociado al medio ambiente hormonal.

La microinyección de ketanserina, bloqueador del receptor 5-HT₂, en el área preóptica medial disminuye la concentración de LH y FSH en el suero, mientras que, cuando se administra metiotepin, bloqueador del receptor 5-HT₁, por la misma vía únicamente disminuye la concentración de LH. Estos resultados llevaron a los autores a proponer que la serotonina modula la secreción de las gonadotropinas y que sus efectos dependen del tipo de receptor que se expresa (Gouveia y Rodrigues, 2004).

Otra posibilidad es que la serotonina actúe directamente en la hipófisis donde modularía la secreción de FSH y LH. En algunas especies de mamíferos como es la rata, el ratón y el murciélago por estudios de inmunohistoquímica se han identificado fibras serotoninérgicas en la adenohipófisis y neurohipófisis (Jennes y col., 1982; Payette y col., 1985). La posibilidad de que la serotonina presente en la hipófisis cumpla alguna función es apoyada por el hecho de que cuando se incubaba tejido de adenohipófisis con un inhibidor de la recaptura de serotonina, se reduce la concentración de LH en el tejido incubado (Johns y col., 1982). Si se inyecta intraperitonealmente 8-DPAT (agonista a serotonina de los receptores 5-HT_{1A}) a ratas de 16 días de edad, la concentración de PRL se incrementa en suero e hipófisis, por lo que se sugiere que la serotonina estimula la secreción de PRL al actuar directamente en esta glándula (Aguilar y col., 1993). Un efecto similar se observó en ratas hembra de 60 días de edad, tratada con fluoxetina (inhibidor

selectivo de la recaptura de serotonina) y posteriormente con 8-DPAT (agonista del receptor a serotonina 5-HT_{1A}), la concentración de PRL disminuyó en el suero, de estos animales (Van de Kar y col., 2002).

En relación a la participación de la serotonina en la regulación de las funciones del ovario, se ha mostrado que en la rata esta amina junto con la histamina son esenciales para que se lleve a cabo el proceso local inflamatorio que precede a la ruptura del folículo. Schmidt y col. (1988) mostraron que cuando los ovarios de rata se mantienen en un medio de perfusión, al que se le agrega la metisergide, bloqueador de los receptores a serotonina del tipo 5-HT_{2A}, más serotonina se inhibe completamente la ovulación. Por otro lado se ha observado en ratas adultas cíclicas que la concentración de serotonina se incrementa el día de la ovulación. Sin embargo, cuando en la rata prepúber la ovulación es inducida por la administración de la gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG), no se detecta esta amina en el ovario (Clausell y Soliman, 1977). Estos resultados llevan a pensar que la serotonina es esencial para que se lleve a cabo la ovulación espontánea. Mientras que en el animal prepúber parece no participar.

Otra de las funciones de la serotonina es la modulación de la secreción de hormonas esteroideas. La administración de ketaserina por vía oral a ratas adultas en proestro la concentración de progesterona y estradiol en suero son menores que en los animales testigo (Jahn y Deis, 1988). Este mismo comportamiento se observó cuando los folículos de rata son incubados en presencia de ketanserina (Tanaka y col., 1993). Cuando las células de la granulosa de folículos de mujer son mantenidas *in vitro* y se le adiciona serotonina al medio se incrementa la síntesis de progesterona y estradiol (Bódis y col., 1992). En células del cuerpo lúteo de vaca mantenidas *in vitro* la adición de serotonina al medio, incrementa la concentración de progesterona, cuando se agrega serotonina y mianserina, antagonista de los receptores a serotonina del tipo 5-HT₁ y 5-HT₂ la concentración de progesterona es menor, por lo que se sugiere que la serotonina modula de la secreción de hormonas esteroideas al unirse a los receptores antes mencionados (Battista y Condon, 1986).

Estos resultados apoyan la idea de que la serotonina ejerce un papel estimulante en la síntesis de hormonas esteroideas por el ovario.

La posibilidad de que la serotonina se sintetiza y actúa en el ovario se ha propuesto para diferentes especies de mamíferos, entre ellos los roedores. Esto se apoya en la existencia de los receptores 5-HT_{2B}, 5-HT_{2A} y 5-HT₇ en células del cumulus oóforus del ratón, de 5-HT₇ y 5-HT_{1D} en el ovocito (Dubé y Amireault, 2007) y la presencia de la triptófano hidroxilasa en células de la granulosa del *cumulus ooforus*, del ovario de ratón (Amireault y Dubé, 2005).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La serotonina participa en la modulación de las funciones del ovario ya que la administración de agonistas o antagonistas a serotonina resulta en un incremento o disminución de la secreción de gonadotropinas y de la ovulación en la rata. Sin embargo, se desconoce si esta amina también actúa directamente en el ovario regulando su funcionamiento y en particular en la esteroidogénesis. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de dos antagonistas a serotonina: ketanserina (bloqueador de los receptor 5-HT_{2A}) y metisergide (bloqueador de los receptor 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) directamente en la bursa del ovario sobre la secreción de progesterona, testosterona y estradiol.

HIPÓTESIS

Si en el ovario la serotonina ejerce un efecto estimulante de la esteroidogénesis, entonces el bloqueo de los receptores a serotonina del tipo 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} directamente en la bursa del ovario provocará la disminución en la síntesis de progesterona, testosterona y estradiol.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar los efectos de la administración de antagonistas de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} en la bursa del ovario de ratas hembra prepúberes, sobre la secreción de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y estradiol).

OBJETIVOS PARTICULARES

- ✘ Analizar los efectos de la administración de sulfato de serotonina (5-HT) por vía sistémica sobre la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.
- ✘ Analizar los efectos de la administración de ketanserina (antagonista del receptor a serotonina 5-HT_{2A}) en bursa del ovario, sobre la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) en el ovario.
- ✘ Analizar los efectos de la administración de ketanserina (antagonista del receptor a serotonina 5-HT_{2A}) sobre la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.
- ✘ Analizar los efectos de la administración de metisergide (antagonista de los receptores a serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) en bursa del ovario, sobre la concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) en el ovario.
- ✘ Analizar los efectos de la administración de metisergide (antagonista de los receptores a serotonina 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}) sobre la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Animales, Tratamiento y Fármacos.

Ratas hembra de 30 días de edad de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de iluminación (14 horas de luz) y con libre acceso a la madre hasta el momento del destete (21 días) y posteriormente al alimento y agua *ad libitum*, se dividieron al azar en diferentes grupos experimentales.

Procedimiento de administración de fármacos en bursa del ovario.

Los animales se anestesiaron con éter, se les realizó una incisión de piel y músculo en la región ventral del abdomen. Se localizaron los ovarios, se expusieron y se procedió a realizar la inyección del fármaco en la bursa de ambos ovarios siguiendo el procedimiento habitual del laboratorio (Domínguez y col., 1998; Gallegos, 2007) se utilizó una jeringa para insulina ½ cc y la aguja de inyección se mantuvo en la misma posición por un minuto para asegurar que el fármaco difundiera al tejido ovárico y posteriormente se retiró la aguja. Concluido el tiempo los ovarios se regresaron a la cavidad abdominal y se suturó el músculo y la piel. Este procedimiento se realizó en cada uno de los ovarios de los animales. Siguiendo el procedimiento previamente descrito por otros autores (Domínguez y col., 1998; Gallegos, 2007).

Procedimiento de Autopsia.

Los animales de los diferentes grupos se sacrificaron por decapitación 24 ó 48 horas después del tratamiento. Se colectó la sangre del tronco, se dejó coagular por 20 minutos, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, se separó el suero y se almacenó a -20°C, para la posterior cuantificación de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y 17β-estradiol).

Se disecaron los ovarios y la hipófisis, los que se almacenaron en un ultra congelador a -70°C para la posterior cuantificación de 5-HT y catecolaminas.

Cuantificación de Hormonas Esteroides.

La concentración de progesterona, testosterona y estradiol se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, con un estuche obtenido de Kit Coa-A-Count, USA (Diagnostic Products, Los angeles, CA). La concentración de progesterona se expresó en ng/ml y la de estradiol y testosterona en pg/ml de suero (Apéndice 1).

Cuantificación de Serotonina y Catecolaminas.

Los ovarios y las hipófisis se pesaron y se homogeneizaron en 300 μl ó 150 μl de ácido perclórico (HClO_4) al 0.1 N, respectivamente, se centrifugaron a 12,500 rpm a -4°C durante 30 min, el sobrenadante de las muestras de ovario se filtró utilizando filtros de celulosa regenerada de tamaño de poro de 0.45 μm , y se inyectaron 100 μl del filtrado al sistema de cromatografía de líquidos, el sobrenadante de las muestras de hipófisis no se filtro y se inyectaron 100 μl al sistema de cromatografía de líquidos y se midió la concentración de serotonina (5-HT), ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), noradrenalina (NA), ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3, 4-dihidroxifenilacético (DOPAC).

El equipo de HPLC consistió en una bomba isocrática (modelo L-250, Perkin Elmer), una válvula de inyección (Reodine modelo 7125, una precolumna de silica (3.5 cm. X 4.6mm) y una columna C-18 de fase reversa (25cm X 4.6mm) adaptada a un detector electroquímico amperométrico LC-4C (Bioanalytical System Inc. USA) incorporado a un inyector Nelson 1020 (Perkin Elmer) (Apéndice 2). La concentración de los neurotransmisores se expresó en ng/mg de tejido.

Grupos Experimentales

1.-Efecto de la administración de sulfato de serotonina (S5-HT).

A fin de analizar la participación de la serotonina en la modulación de la esteroidogénesis, se evaluaron los efectos de la administración de sulfato de serotonina, un agonista de todos los receptores a serotonina, en la secreción de progesterona, testosterona y estradiol.

Ratas hembra de 30 días de edad fueron inyectadas con S5-HT (Sigma Chemical, St Louis, USA) en una concentración de 37.5 mg/ kg de peso corporal disuelta en solución salina. Grupos de animales se sacrificaron a las 24 ó 48 horas posteriores al tratamiento. Como grupo de comparación se utilizaron animales testigo absoluto (TA) que se sacrificaron a los 31 o 32 días de edad.

2.-Efecto de la administración de antagonistas de los receptores a serotonina en la bursa del ovario (BO).

A ratas hembra de 30 días se les inyectó KETA o MESER (Sigma Chemical, St Louis, USA) 0.1 mg X 40µl/ovario, disuelta en agua destilada en la bursa de ambos ovarios.

3. Efecto de la estimulación de todos los receptores a 5-HT después del bloqueo de los receptores 5HT_{2A} y 5HT_{2C}.

A ratas hembras de 30 días se les inyectó KETA o MESER (Sigma Chemical, St Louis, USA) 0.1 mg X 40µl/ovario, disuelta en agua destilada en la bursa de ambos ovarios. Una hora después se les inyectó S5-HT (concentración de 37.5 mg/ kg de pc) vía sistémica.

Análisis Estadístico.

Los resultados de las concentraciones de P₄, T y E₂ en suero, 5-HT, NA, DA, y sus respectivos metabolitos se analizaron mediante la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) seguido de Tukey o la prueba de Kruskal-Wallis. Cuando se compararon dos grupos se utilizó la prueba de "t" de Student o la prueba de U de Mann-Whitney. Se consideraron como diferencias significativas cuando la probabilidad fue ≤ 0.05 .

RESULTADOS

1.- Efectos de la administración de sulfato de serotonina (S5-HT) por vía sistémica.

Concentración de catecolaminas y serotonina.

En comparación con el grupo testigo absoluto en los animales que se inyectaron con sulfato de serotonina por vía sistémica no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de NA, MHPG, DA y DOPAC en hipófisis, mientras que en los ovarios la concentración de DA y DOPAC estuvo por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/mg de tejido) (cuadros 2 y 3).

Cuadro 2. Concentración (ng/mg de tejido) (media \pm e.e.m.) de noradrenalina (NA), ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3, 4-dihidroxifenilacetico (DOPAC) en hipófisis de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.

Hora / Grupo	n	NA	MHPG	DA	DOPAC
24 Horas					
TA	8	0.17 \pm 0.09	0.44 \pm 0.09	0.38 \pm 0.12	0.25 \pm 0.15
S5-HT	12	0.47 \pm 0.16	0.64 \pm 0.13	0.36 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01
48 Horas					
TA	7	0.17 \pm 0.12	0.46 \pm 0.14	0.30 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01
S5-HT	9	0.51 \pm 0.15	0.62 \pm 0.4	0.38 \pm 0.05	0.13 \pm 0.01

Cuadro 3. Concentración (ng/mg de tejido) (media \pm e.e.m.) de noradrenalina (NA), ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3, 4-dihidroxifenilacetico (DOPAC) en ovario de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 o 48 horas.

Hora / Grupo	n	NA	MHPG	DA	DOPAC
24 Horas					
TA	16	0.25 \pm 0.03	0.52 \pm 0.06	0.09 \pm 0.05	0.16 \pm 0.09
S5-HT	16	0.27 \pm 0.02	0.52 \pm 0.08	—	—
48 Horas					
TA	13	0.23 \pm 0.02	0.38 \pm 0.02	0.12 \pm 0.07	0.05 \pm 0.01
S5-HT	17	0.30 \pm 0.03	0.46 \pm 0.06	—	0.03 \pm 0.005

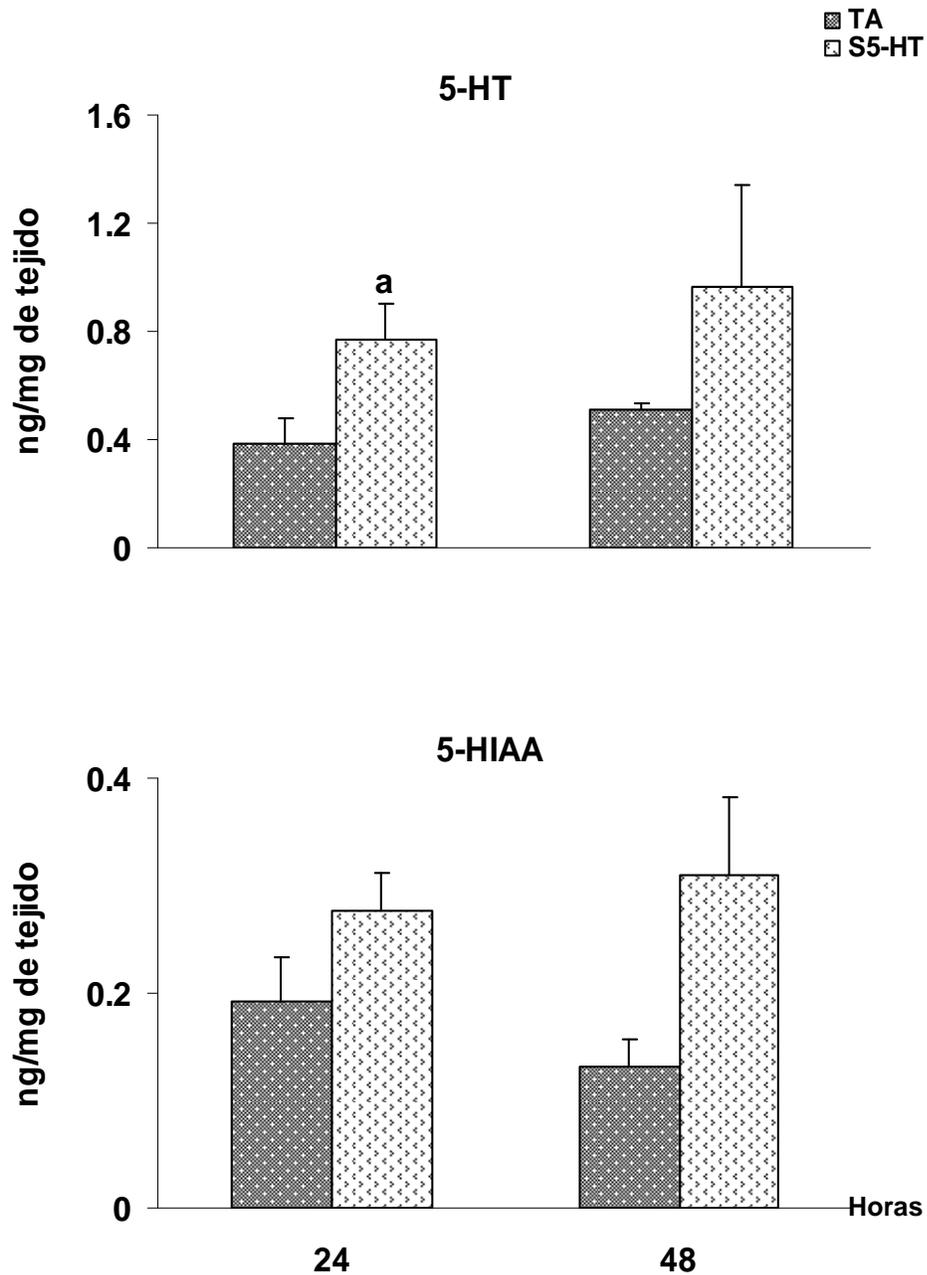
— Valor por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/mg de tejido)

En la hipófisis de los animales que recibieron sulfato de serotonina la concentración de serotonina en aquellos sacrificados a las 24 horas postratamiento fue mayor que en el grupo de animales testigo absoluto y no se presentaron cambios en la concentración del 5-HIAA (Figura 6).

En la figura 7 se muestran los resultados de las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en el ovario de los animales tratados con sulfato de serotonina. Se observa una mayor concentración de 5-HT en los animales tratados con el fármaco y sacrificados 48 horas después en comparación con el grupo TA, y no se presentaron cambios significativos en la concentración del 5-HIAA.

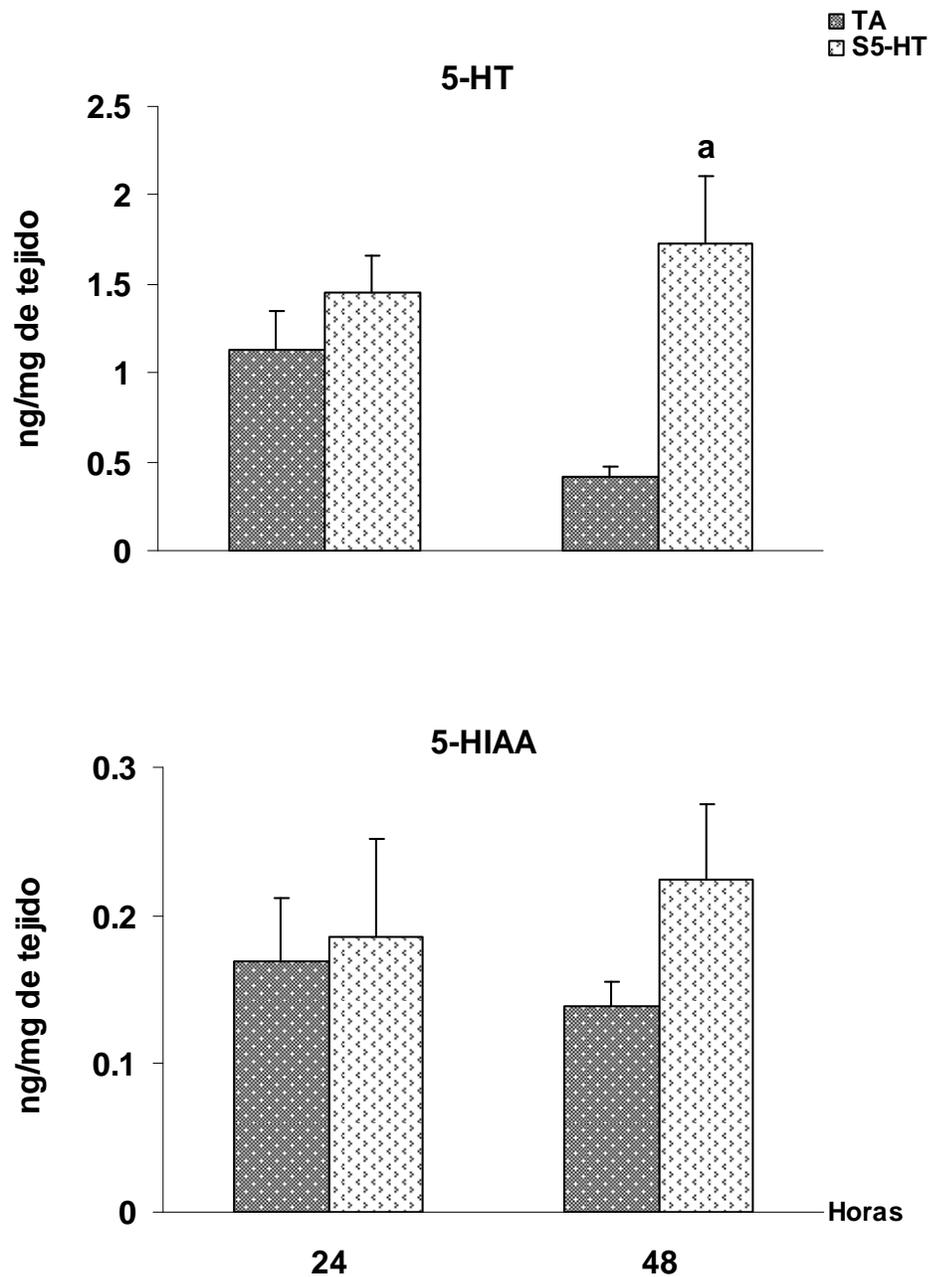
Concentración de hormonas esteroides.

En comparación con el grupo TA, en los animales inyectados con sulfato de 5HT, la concentración de progesterona fue menor en los animales sacrificados a las 24 horas postratamiento, así como la concentración de testosterona (estadísticamente significativo con la prueba U de Mann-Whitney) y el estradiol no mostró diferencia significativa (Figura 8).



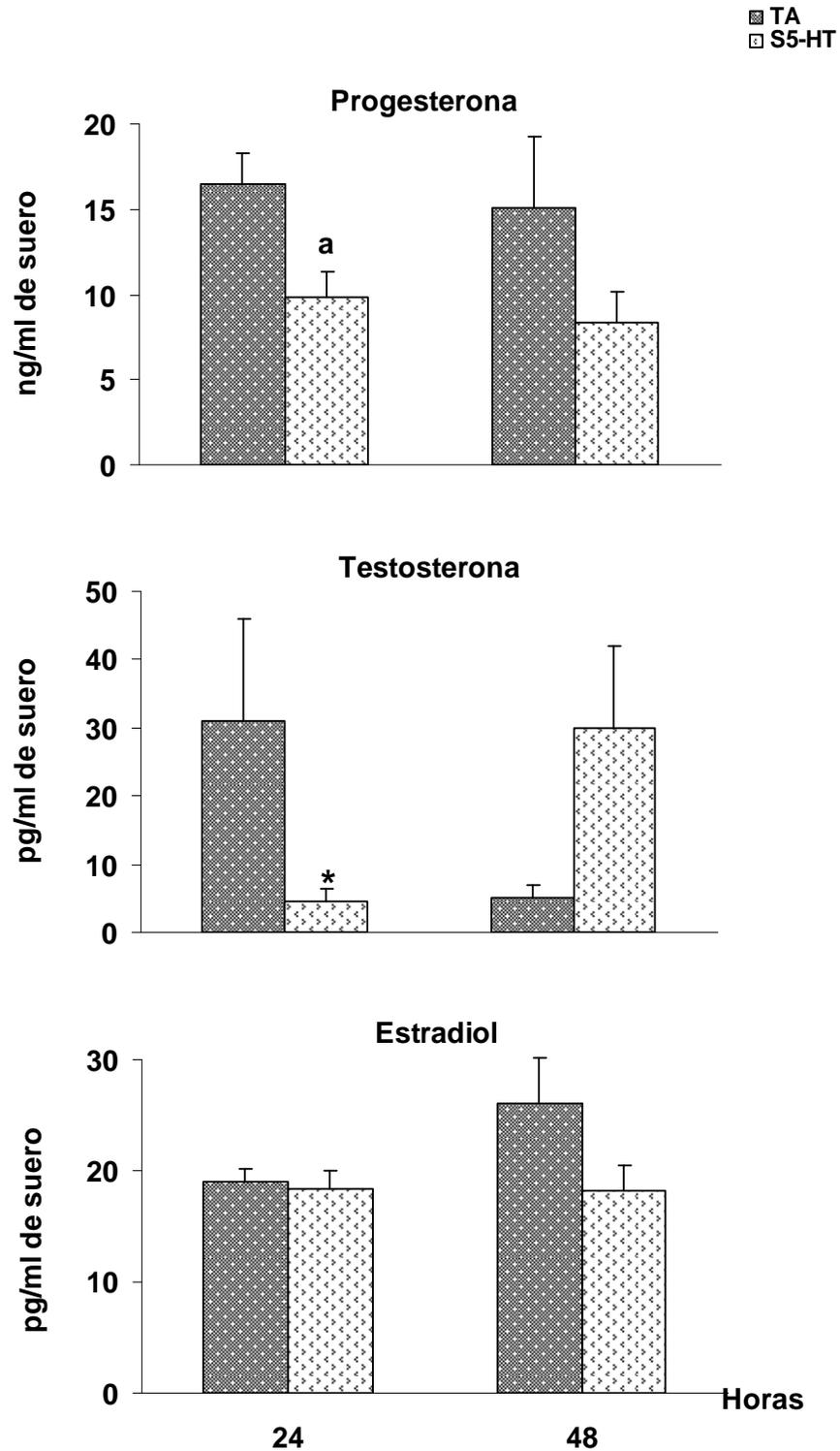
a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student).

Figura 6. Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en hipófisis de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.



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

Figura 7. Concentración (Media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.



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

* $p < 0.05$ vs. TA (prueba U de Mann-Whitney).

Figura 8. Concentración (Media \pm e.e.m.) de progesterona, testosterona y estradiol en el suero de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.

2.- Efectos de la administración de KETA o MESER en Bursa del Ovario (BO).

Concentración de catecolaminas y serotonina.

En comparación con el grupo de animales TA, en aquellos que recibieron KETA o MESER no se observaron cambios significativos en la concentración de NA y MHPG en el ovario, mientras que la concentración de DA y DOPAC estuvo por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/ mg de tejido). La concentración de DOPAC disminuyó de manera significativa únicamente en los animales a los que se les administró MESER sacrificados a las 48 horas (prueba U de Mann-Whitney) (cuadro 4).

Cuadro 4. Concentración (ng/mg de tejido) (media \pm e.e.m.) de noradrenalina (NA), ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3, 4-dihidroxifenilacetico (DOPAC) en el ovario de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con ketanserina (KETA) o con metisergide (MESER) en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.

Hora / Grupo	n	NA	MHPG	DA	DOPAC
24 Horas					
TA	16	0.25 \pm 0.03	0.52 \pm 0.06	0.09 \pm 0.05	0.16 \pm 0.09
KETA	10	0.54 \pm 0.19	0.24 \pm 0.02	—	0.08 \pm 0.05
MESER	18	0.27 \pm 0.04	0.67 \pm 0.13	0.04 \pm 0.005	0.11 \pm 0.01
48 Horas					
TA	13	0.23 \pm 0.02	0.38 \pm 0.02	0.12 \pm 0.07	0.05 \pm 0.01
KETA	10	0.20 \pm 0.024	0.38 \pm 0.05	—	—
MESER	15	0.38 \pm 0.04	0.64 \pm 0.18	—	0.014 \pm 0.04*

—Valor por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/ mg de tejido).

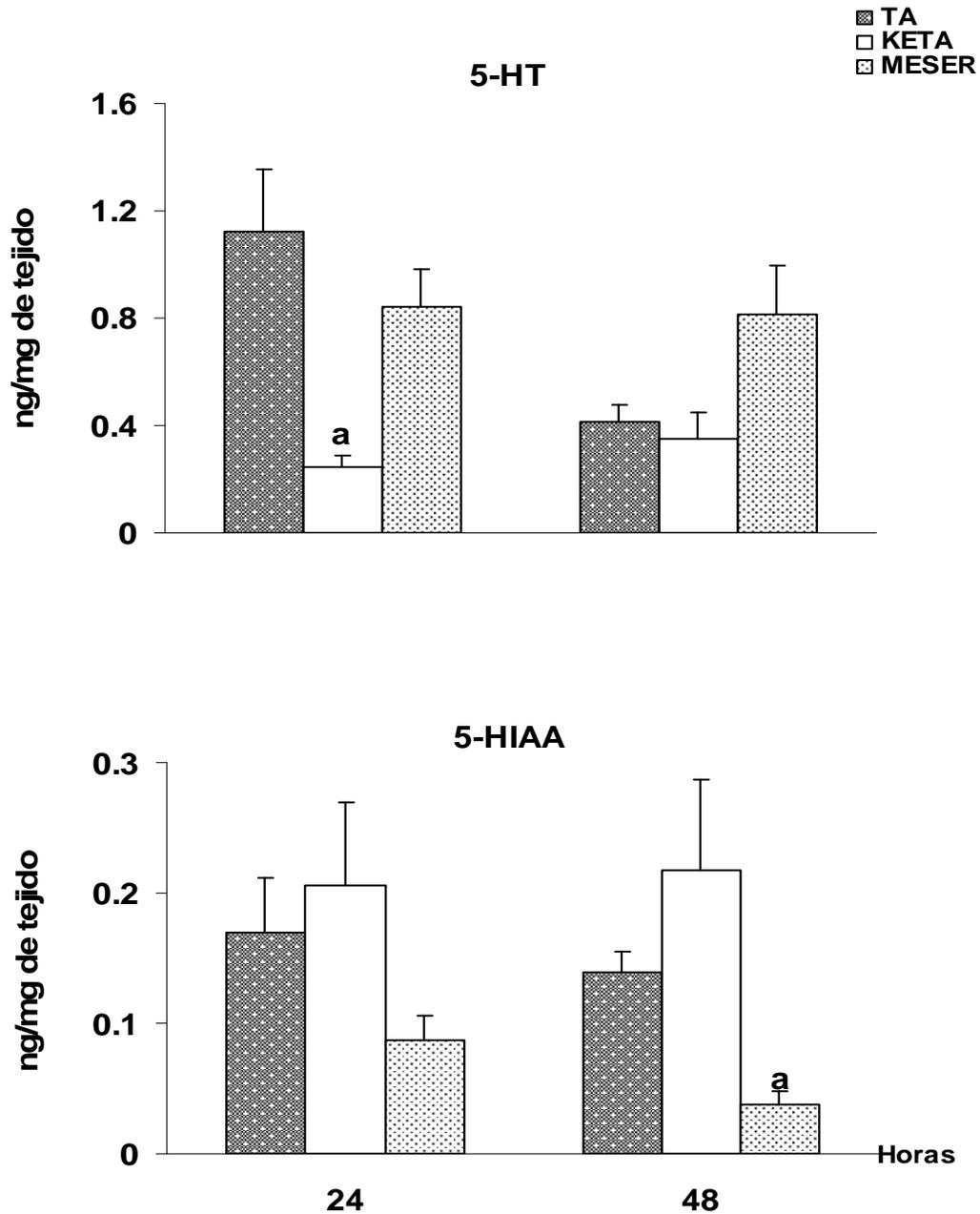
* p<0.05 vs. TA (prueba U de Mann-Whitney).

En relación con el grupo testigo absoluto, en los animales que se les inyectó en BO la KETA y sacrificados a las 24 horas, la concentración de 5-HT fue menor y no se observaron diferencias significativas en la concentración del 5-HIAA. En los animales que se les administró la MESER no se observaron diferencias

significativas en la concentración de serotonina en relación al TA, mientras que, la del 5-HIAA fue menor que en el grupo TA a las 48 horas (Figura 9).

Concentración de hormonas esteroides.

En los animales a los que se les administro KETA o MESER en BO que fueron sacrificados a las 24 horas la concentración de progesterona fue menor en comparación con el grupo TA y no se presentaron cambios significativos en la concentración de testosterona. La concentración de estradiol fue menor en los animales tratados con KETA (Figura 10).



a, $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA, seguida de Tukey).

Figura 9. Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y metabolito de serotonina (5-HIAA) en el ovario de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con Ketanserina (KETA) o con Metisergide (MESER) en la bursa del ovario, en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.

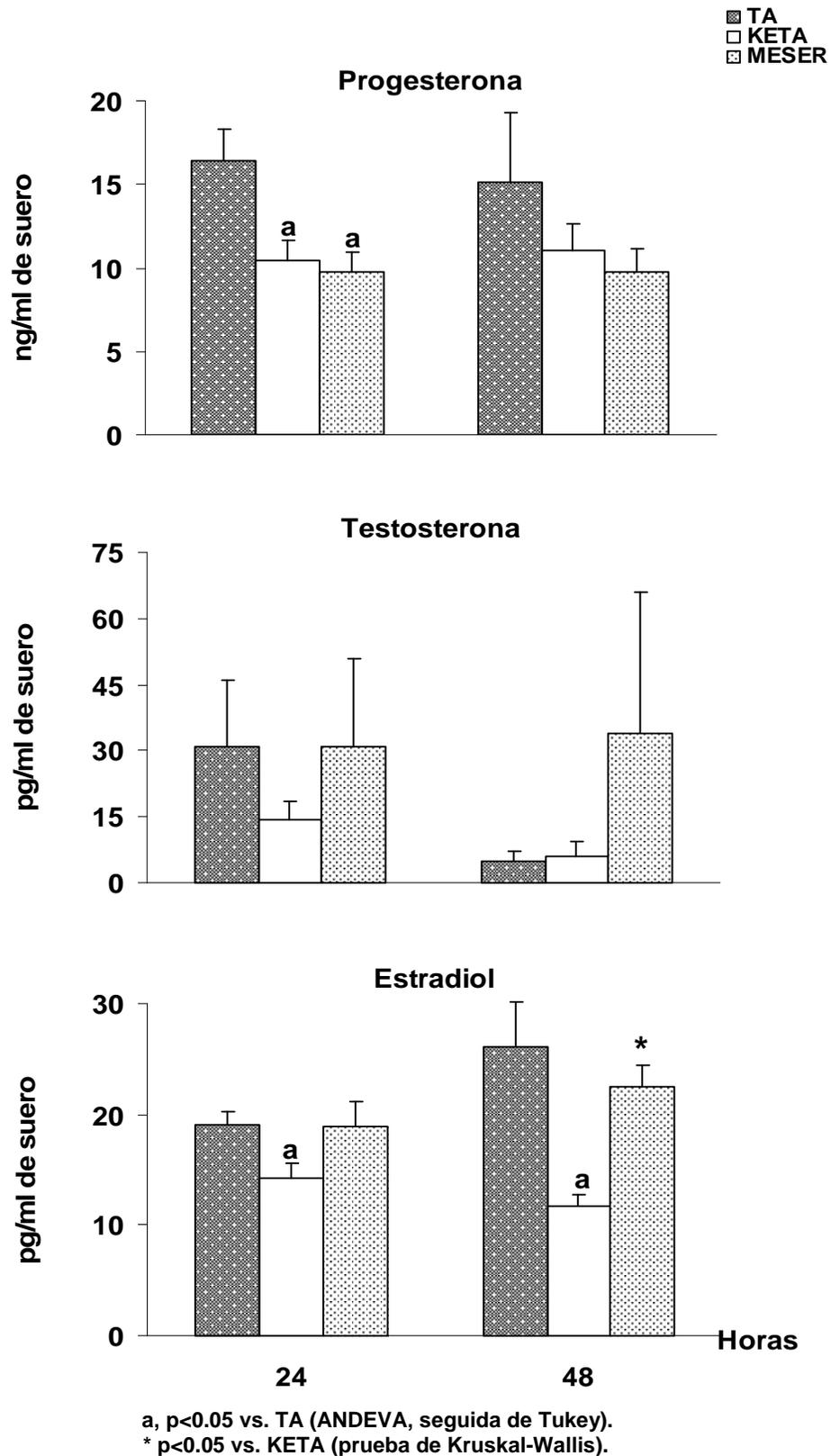


Figura 10. Concentración (media \pm e.e.m.) de progesterona, testosterona y estradiol en suero de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con Ketanserina (KETA) o Metisergide (MESER) en bursa la del ovario, en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.

3.- Efectos de la administración de KETA o MESER en Bursa del Ovario y S5-HT vía sistémica.

Concentración de catecolaminas y serotonina

En los cuadros 5 y 6 se muestran los resultados de la concentración de NA, MHPG, DA y DOPAC en la hipófisis y el ovario de los animales tratados con los fármacos. Como se observa en comparación con el grupo S5-HT no se presentaron cambios significativos en la concentración de catecolaminas en hipófisis, en ovario la concentración de DA y DOPAC estuvo por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/ mg de tejido).

En la figura 11 se observa que en comparación con el grupo tratado con S5-HT por vía sistémica, en los animales que se les administró KETA en BO y S5-HT, la concentración de serotonina en hipófisis fue menor. En relación al grupo KETA en BO y S5HT la concentración de serotonina fue mayor en los tratados con MESER en BO y S5HT. La concentración del 5-HIAA fue menor en todos los animales que recibieron KETA o MESER y S5HT.

En comparación al grupo de animales que recibió S5-HT en los ovarios de los animales tratados con KETA en BO y S5-HT sacrificados a las 24 horas la concentración de 5-HT fue menor. No se presentaron cambios significativos en la concentración de 5-HIAA (Figura 12). Mientras que, en relación al grupo que recibió KETA, la concentración de esta amina fue mayor a las 24 y 48 horas (Figura 14).

La concentración de serotonina fue mayor en el ovario de los animales tratados con MESER y S5HT en comparación al grupo que sólo recibió MESER (Figura 16).

Concentración de hormonas esteroideas.

En comparación con el grupo que recibió S5-HT o KETA en los animales a los que se les administró KETA en BO y S5-HT sacrificados a las 24 ó 48 horas la concentración de progesterona en el suero fue menor (Figuras 13 y 15). Un comportamiento similar se observó en aquellos que recibieron MESER en BO y S5-HT sacrificados a las 24 en relación al grupo tratado con S5HT o MESER (Figura 17). En comparación con el grupo S-5HT la concentración de testosterona fue menor en los animales que recibieron KETA o MESER en BO y S5HT sacrificados a las 48 horas. Un efecto similar se observó en los animales que recibieron KETA y S5HT en comparación a los animales tratados sólo con KETA.

Cuadro 5. Concentración (ng/mg de tejido) (Media \pm e.e.m.) de noradrenalina (NA), ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3, 4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en hipófisis de ratas tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT), con ketanserina más sulfato de serotonina (KETA+S5-HT) o con metisergide más sulfato de serotonina (MESER+S5-HT) en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.

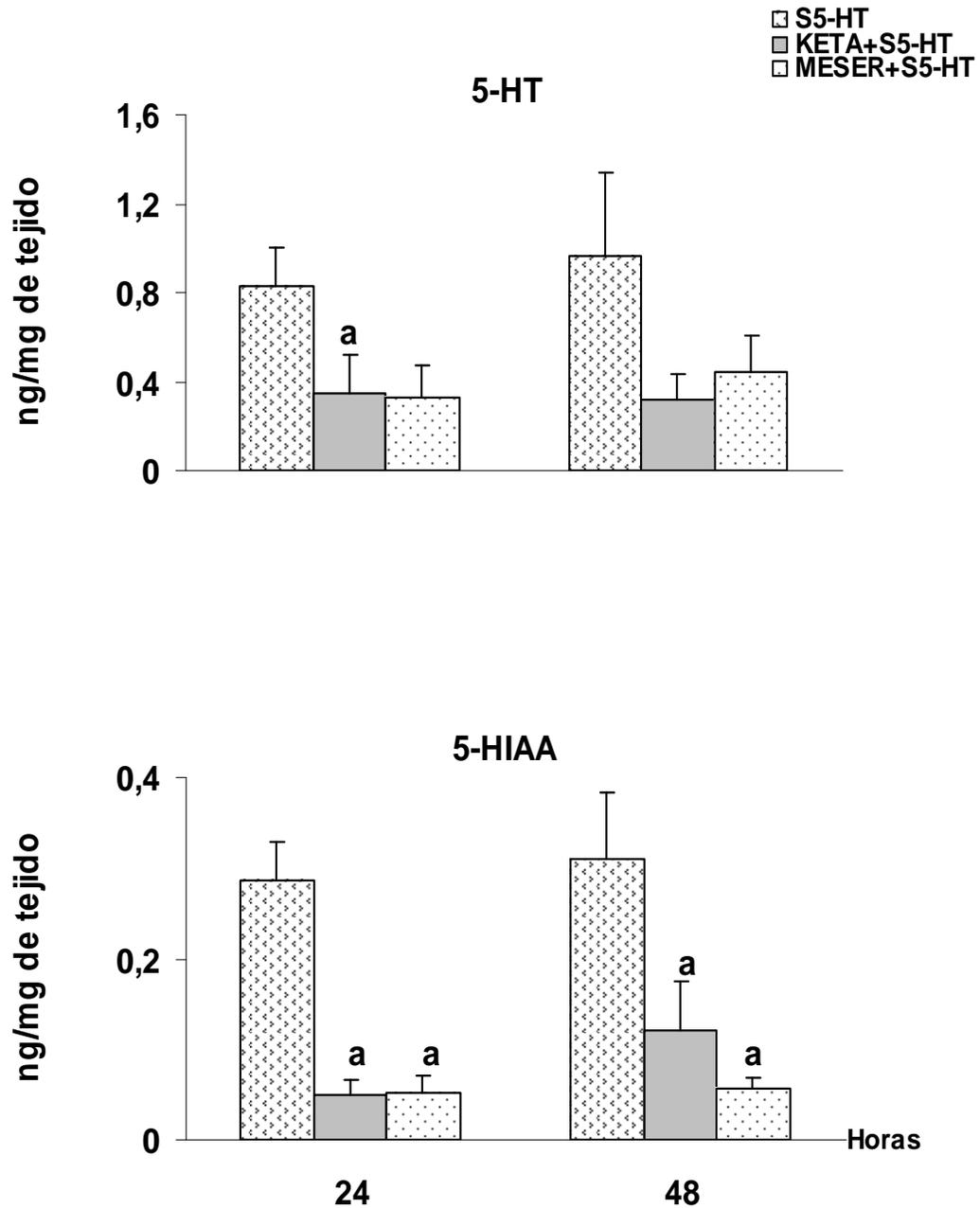
Hora / Grupo	n	NA	MHPG	DA	DOPAC
24 Horas					
S5-HT	12	0.47 \pm 0.16	0.64 \pm 0.13	0.36 \pm 0.03	0.12 \pm 0.01
KETA+S5HT	11	0.04 \pm 0.02	0.86 \pm 0.59	0.18 \pm 0.09	0.04 \pm 0.01
MESER+SHT	11	0.24 \pm 0.15	0.76 \pm 0.48	0.13 \pm 0.07	0.01 \pm 0.001
48 Horas					
S5-HT	9	0.51 \pm 0.15	0.62 \pm 0.4	0.38 \pm 0.05	0.13 \pm 0.01
KETA+S5HT	8	0.02 \pm 0.002	—	0.26 \pm 0.12	0.08 \pm 0.04
MESER+SHT	11	0.16 \pm 0.08	0.57 \pm 0.28	0.17 \pm 0.05	0.05 \pm 0.01

— Valor por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/ mg de tejido)

Cuadro 6. Concentración (ng/mg de tejido) (Media \pm e.e.m.) de noradrenalina (NA), ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3, 4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en ovario de ratas tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT), con ketanserina más sulfato de serotonina (KETA+S5-HT) o con metisergide más sulfato de serotonina (MESER+S5-HT) en el día 30 y sacrificadas a las 24 o 48 horas.

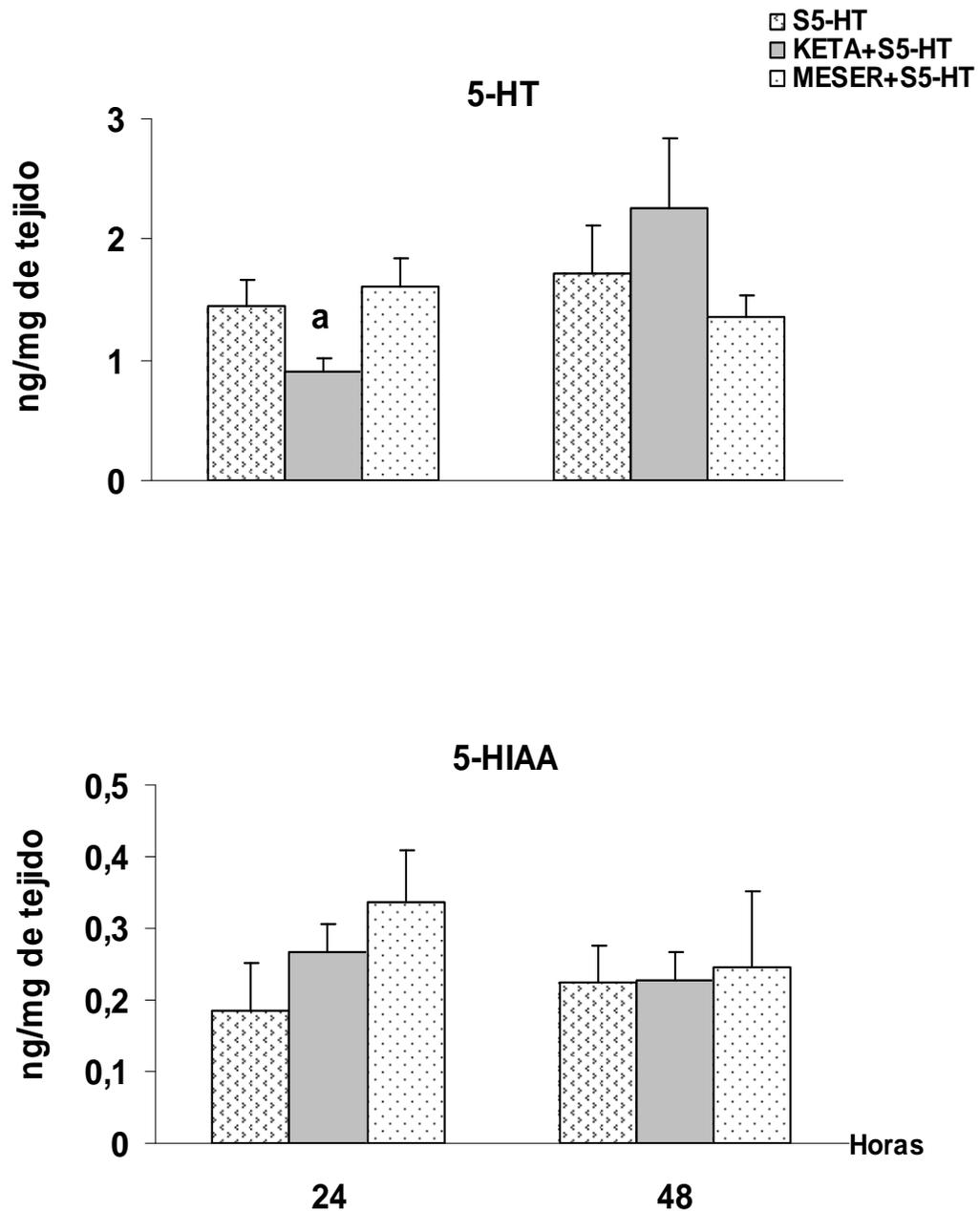
Hora / Grupo	n	NA	MHPG	DA	DOPAC
24 Horas					
S5-HT	16	0.27 \pm 0.02	0.52 \pm 0.08	—	—
KETA+S5HT	18	0.16 \pm 0.03	0.40 \pm 0.08	0.08 \pm 0.02	—
MESER+S5HT	22	0.22 \pm 0.03	0.25 \pm 0.05	0.04 \pm 0.003	0.55 \pm 0.11
48 Horas					
S5-HT	17	0.30 \pm 0.03	0.46 \pm 0.06	—	0.03 \pm 0.005
KETA+S5-HT	10	0.21 \pm 0.01	0.33 \pm 0.04	0.11 \pm 0.02	0.08 \pm 0.03
MESER+S5HT	19	0.32 \pm 0.03	0.72 \pm 0.18	0.10 \pm 0.06	0.21 \pm 0.07

— Valor por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/ mg de tejido)



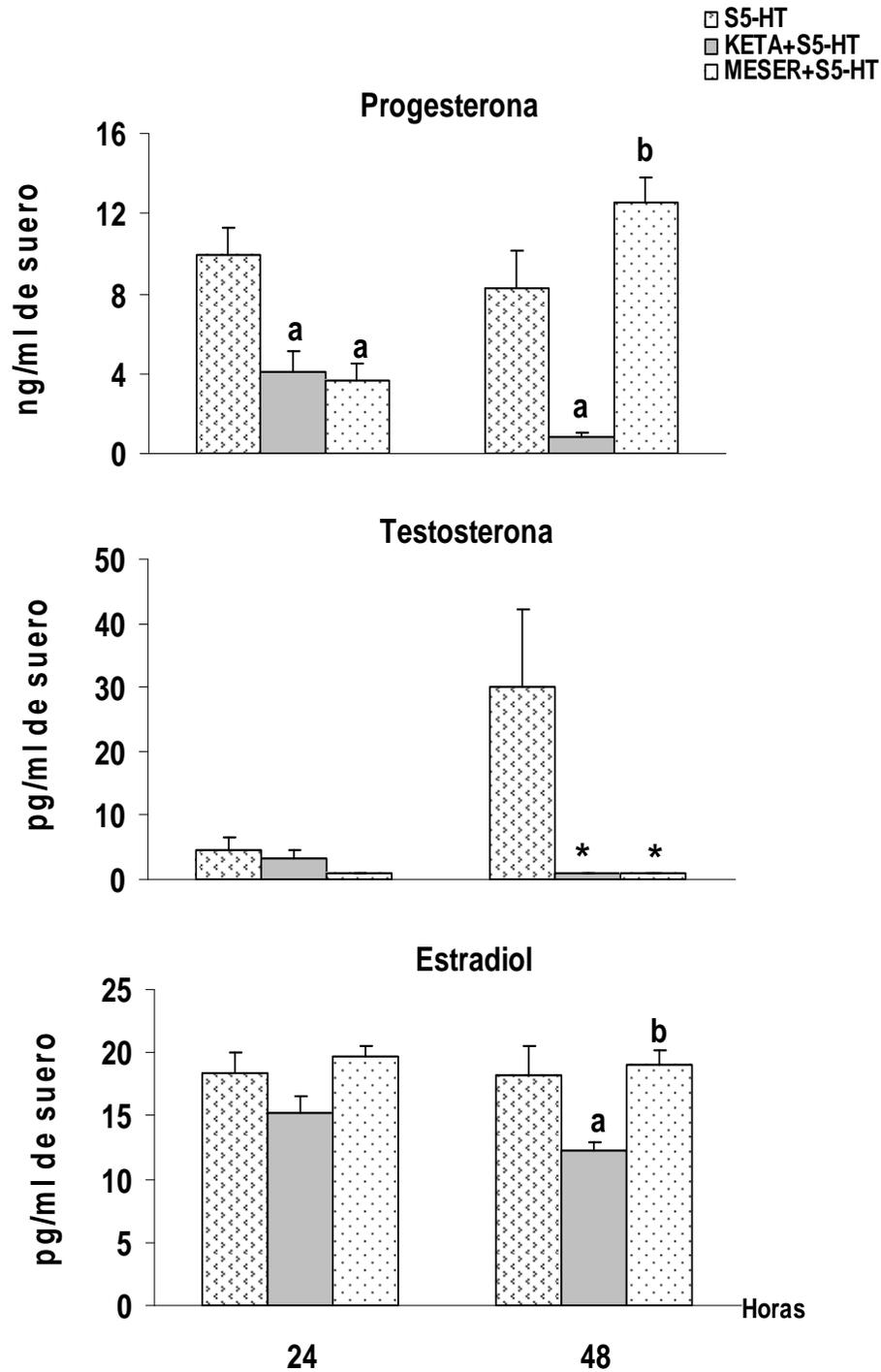
a, $p < 0.05$ vs. S5-HT (ANDEVA, seguida de Tukey).

Figura 11. Concentración (Media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y metabolito de serotonina (5-HIAA) en hipófisis de ratas tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT) o Ketanserina más sulfato de serotonina (KETA+S5-HT) o Metisergide más sulfato de serotonina (MESER+S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.



a, $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA, seguida de Tukey).

Figura 12. Concentración (Media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y metabolito de serotonina (5-HIAA) en ovario de ratas tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT) o Ketanserina más sulfato de serotonina (KETA+S5-HT) o Metisergide más serotonina (MESER+S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.

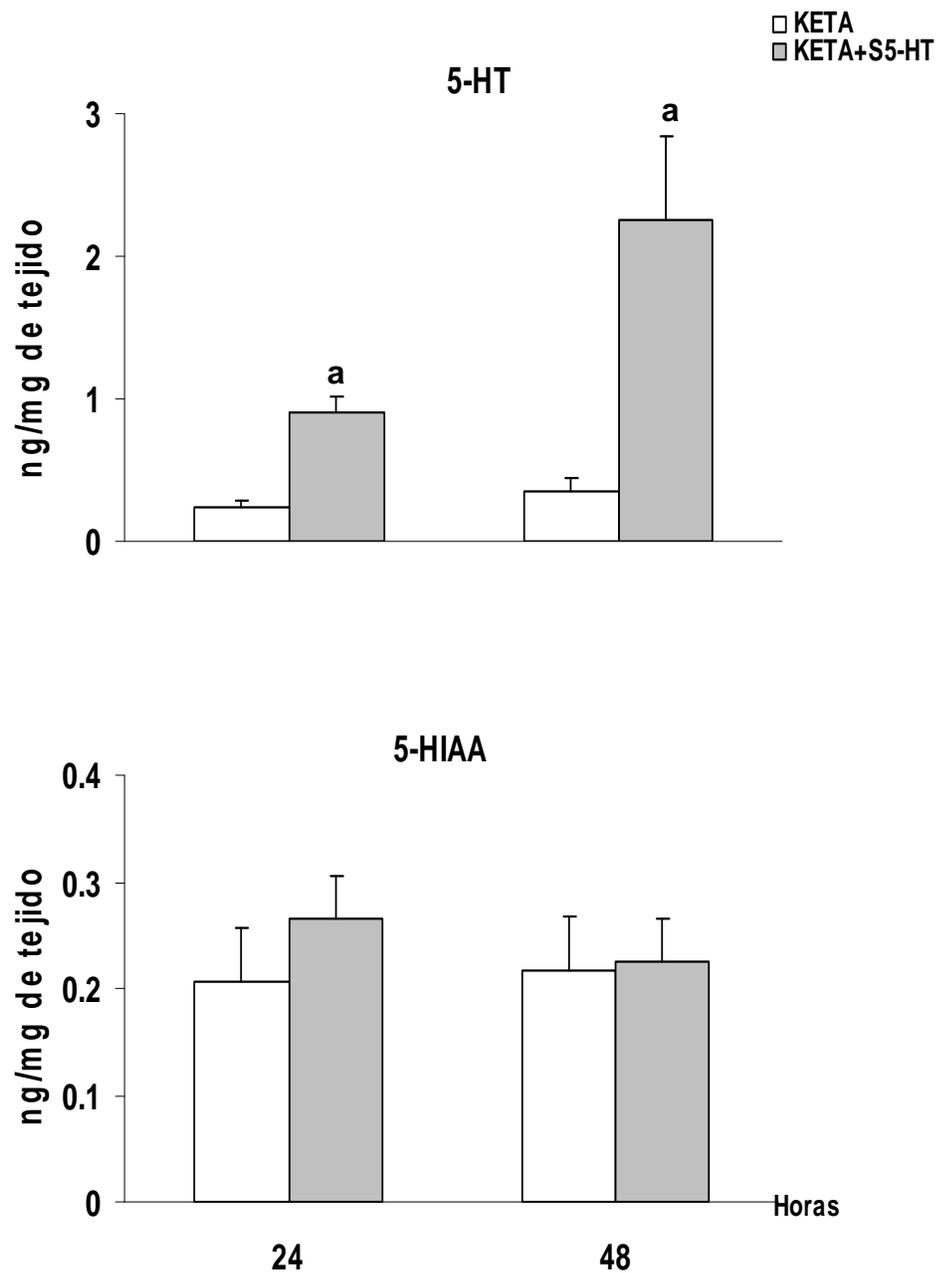


a, $p < 0.05$ vs. S5-HT (ANDEVA, seguida de Tukey).

b, $p < 0.05$ vs. KETA+S5-HT (ANDEVA, seguida de Tukey).

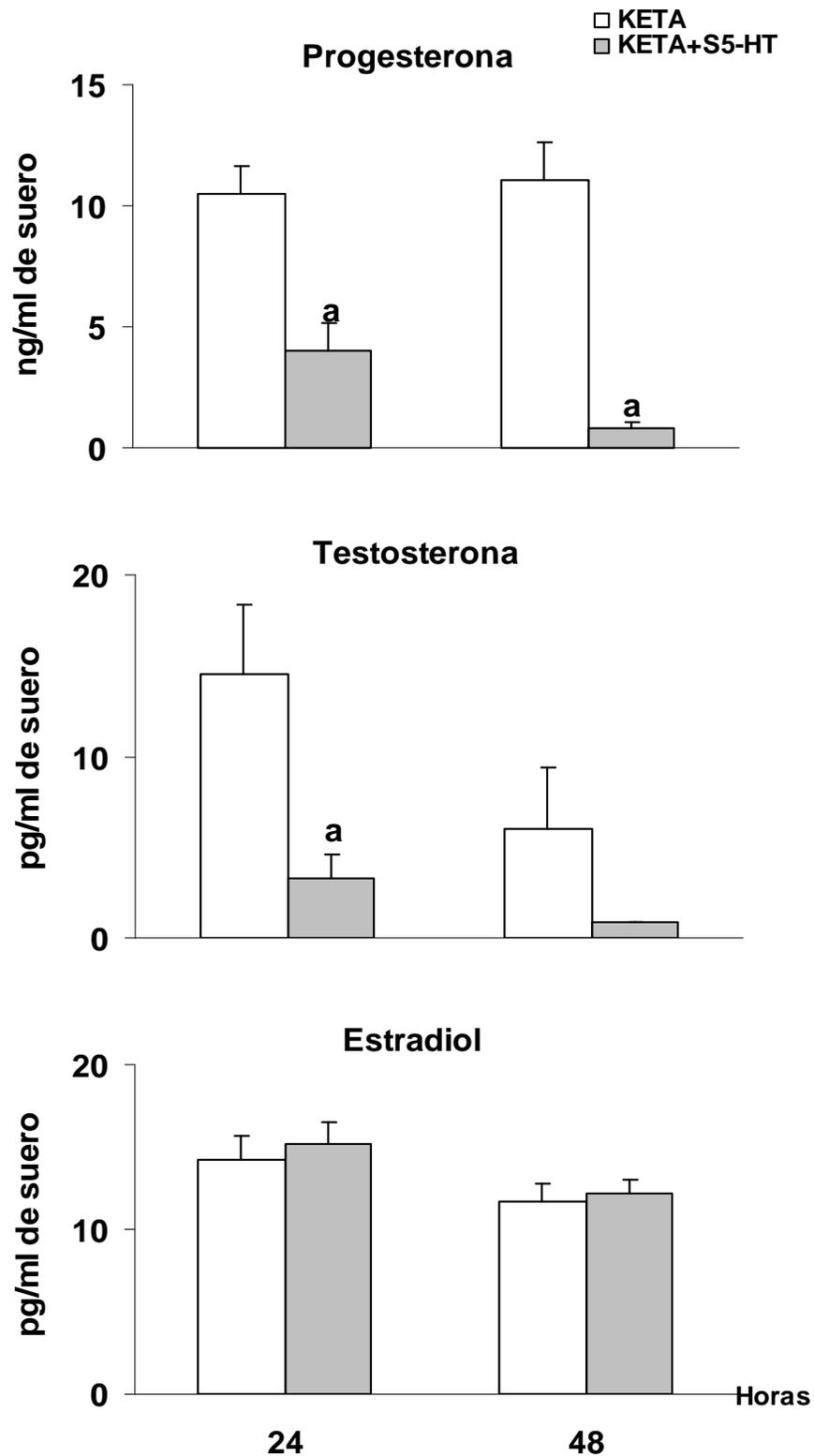
* $p < 0.05$ vs. S5-HT (prueba de Kruskal-Wallis).

Figura 13. Concentración (Media \pm e.e.m.) de progesterona, testosterona y estradiol en suero de ratas tratadas con sulfato de serotonina (S5-HT) o Ketanserina más sulfato de serotonina (KETA+S5-HT) o Metisergide más sulfato de serotonina (MESER+S5-HT) en la bursa del ovario, en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.



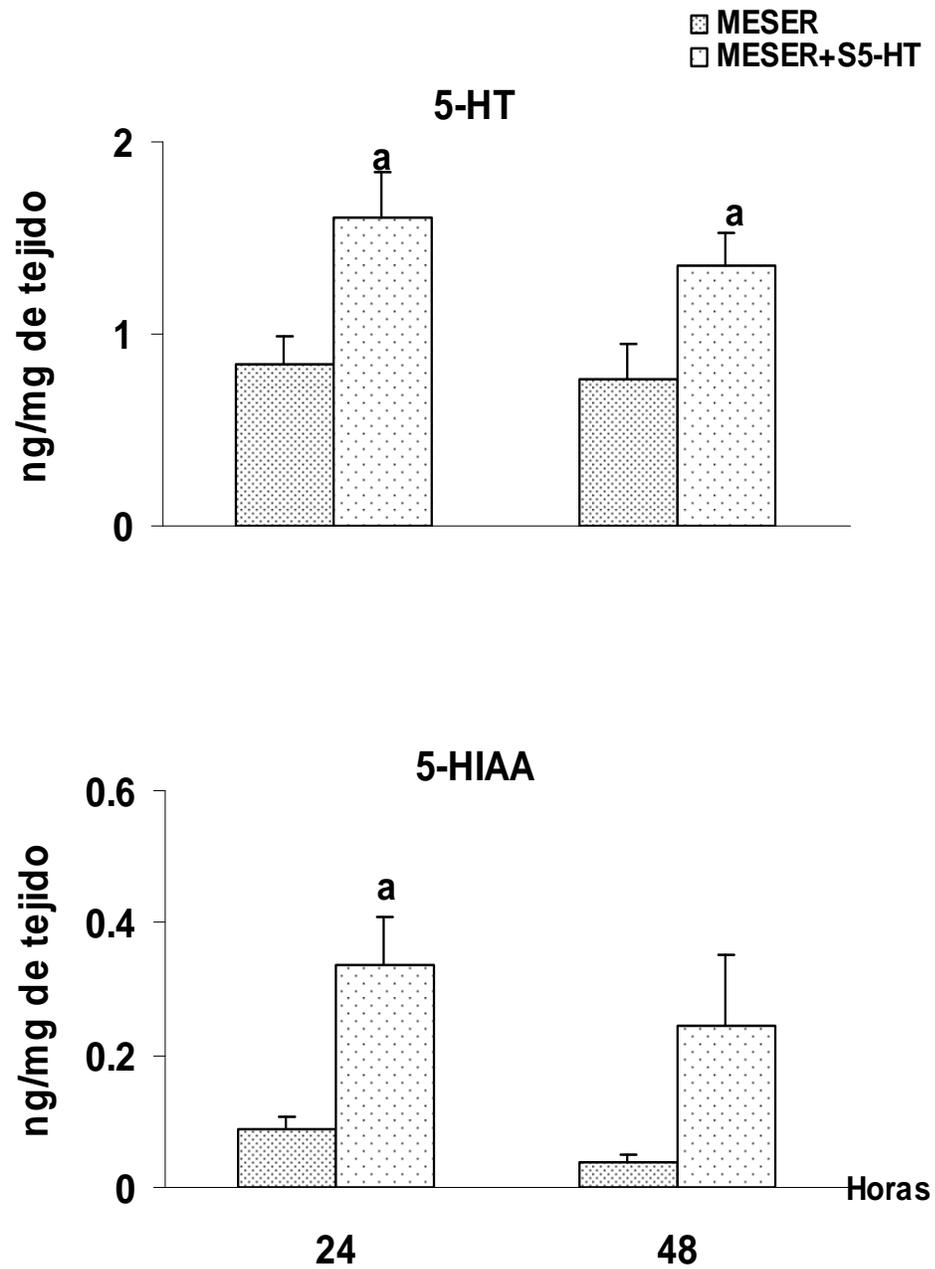
a, $p < 0.05$ vs. TA (Prueba "t" de Student).

Figura 14. Concentración (Media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y metabolito de serotonina (5-HIAA) en ovario de ratas tratadas con Ketanserina (KETA) ó ketanserina más sulfato de serotonina (KETA+S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.



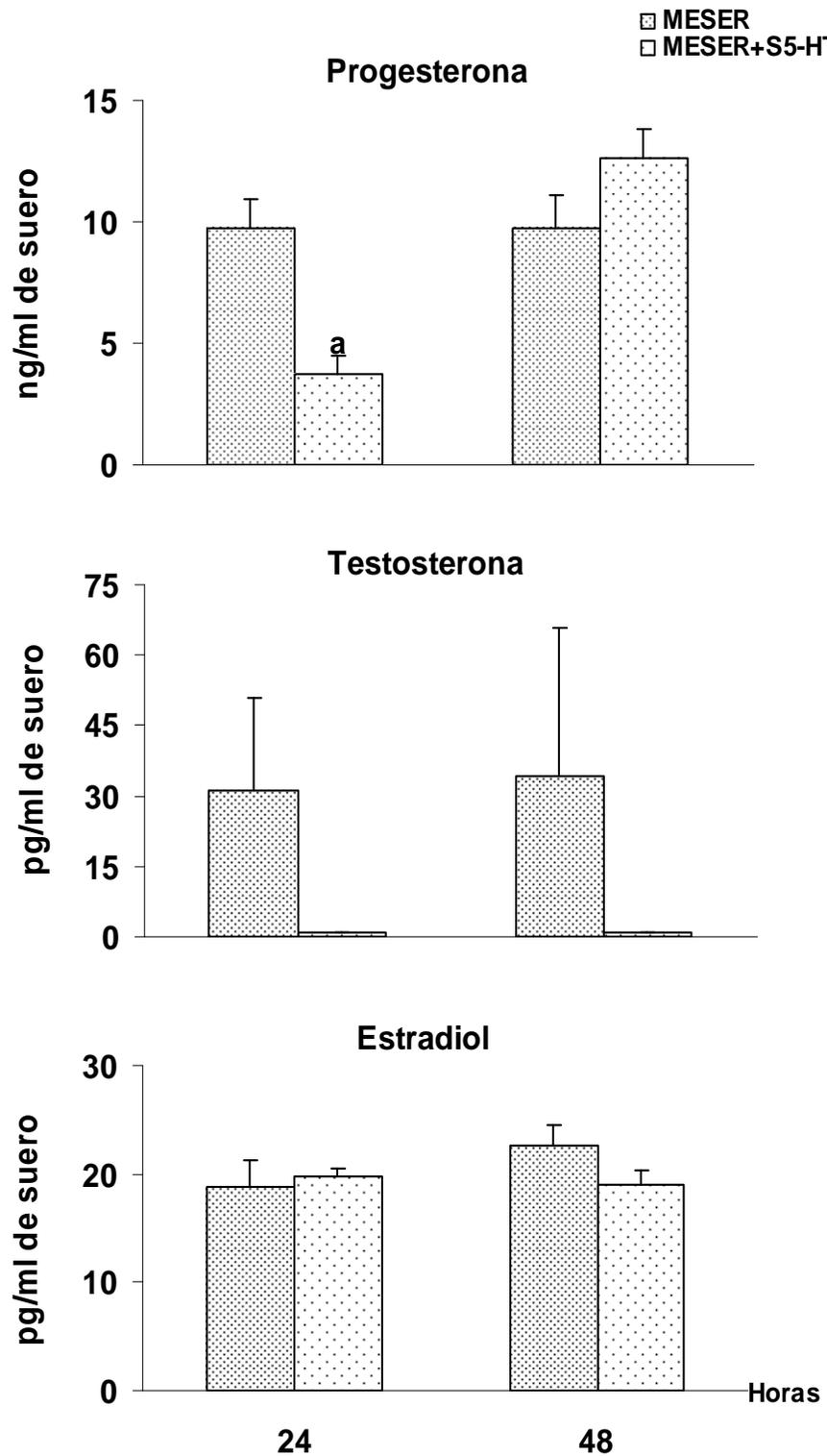
a, $p < 0.05$ vs. TA (ANDEVA, seguida de Tukey)

Figura 15. Concentración (media \pm e.e.m.) de progesterona, testosterona y estradiol en suero de ratas tratadas con Ketanserina (KETA) o con ketanserina más sulfato de serotonina (KETA+S5-HT) en bursa la del ovario, en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.



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

Figura 16. Concentración (Media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y metabolito de serotonina (5-HIAA) en ovario de ratas tratadas con metisergide (MESER) ó metisergide más sulfato de serotonina (MESER+S5-HT), en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.



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

Figura 17. Concentración (media \pm e.e.m.) de progesterona, testosterona y estradiol en suero de ratas tratadas con metisergide (MESER) o con metisergide más sulfato de serotonina (MESER+S5-HT) en bursa la del ovario, en el día 30 y sacrificadas a las 24 ó 48 horas.

DISCUSIÓN

Dado que el bloqueo de los receptores a 5-HT del ovario resultó en una menor secreción de P_4 o E_2 , postulo que la 5-HT modula la secreción de estas hormonas por su acción directa sobre el ovario.

La menor concentración de progesterona observada en los animales que recibieron sulfato de serotonina por vía sistémica posiblemente es el resultado de que la amina ejerce un papel inhibitorio en el funcionamiento de los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, como ha sido previamente planteada por otros autores (Vitale y col, 1986; Arias y col 1990; Gallegos, 2007), quienes señalan que la serotonina modula la secreción de la GnRH y como consecuencia la secreción de gonadotropinas en la hipófisis, principalmente de la LH que al actuar en el ovario modula la secreción de progesterona (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

La disminución en la concentración de progesterona observada en los animales tratados con sulfato de serotonina podría estar vinculada con la disminución en la secreción de LH y como consecuencia de los complejos enzimáticos que participan en la síntesis de progesterona (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Aunque el sulfato de serotonina no atraviese barrera hematoencefálica (Rose y Bleszynski, 1971), la eminencia media, región donde se ubican las terminales de las neuronas que liberan GnRH al sistema portal-hipofisario, se encuentra fuera de esta barrera (Kandel y col., 1991), por lo que es posible sugerir que el sulfato de serotonina actuó en eminencia media donde modificó la secreción de la GnRH y como consecuencia la de LH en la hipófisis. Esta posibilidad se apoya en el hecho de que el agregado de sulfato de serotonina al medio de cultivo de eminencias medias obtenidas de ratas en proestro, induce una mayor liberación de GnRH al medio de cultivo que en los grupos testigo (Vitale y col.,1986). En una línea inmortalizada de células que liberan GnRH (GT1-1), se identificó el receptor 5-HT₇ y

cuando se agrega al medio el 8-hidroxi-2-(dinitro-propilamino) tetralina, agonista de estos receptores, se incrementa la liberación de GnRH(Héry y col., 1997).

También es posible que la disminución en la secreción de progesterona observada en los animales tratados con sulfato de serotonina por vía sistémica, sea el resultado de la acción de la serotonina directamente en la hipófisis en donde regula la secreción de la LH. Esta interpretación se basa en el hecho de que en nuestro estudio observamos que la concentración de 5-HT y 5-HIAA se incrementa en la hipófisis de los animales a los que se les administró el sulfato de serotonina por vía sistémica. Estos resultados indican que la serotonina administrada por vía sistémica se acumuló en la hipófisis y que existe un paralelismo entre la acumulación de la amina y su metabolismo. En sistema nervioso, el incremento en la concentración del metabolito de serotonina se considera como un índice de mayor actividad del sistema serotoninérgico (Kerdellhue y col., 1989).

La posibilidad de que la serotonina actué en la hipófisis modulando la secreción de gonadotropinas se apoya en diversos resultados. La serotonina se localiza en los tres lóbulos de la hipófisis (Vanhatalo y col., 1995). Esta amina se encuentra en los mastocitos y en la sangre contenida en los vasos sanguíneos en la superficie del lóbulo intermedio (Palkovits y col., 1986). En el lóbulo intermedio y posterior de la hipófisis, se expresa la enzima triptófano hidroxilasa (Saland y col., 1993). En las células de la adenohipófisis se produce recaptura de serotonina (Johns y col., 1982). En hipófisis de ratas macho mantenidas *in vitro* cuando se le adiciona serotonina y fluoxetina, inhibidor de la recaptura de serotonina, en los gonadotropos se reduce la densidad de los gránulos que contienen la amina (Johns y col., 1982). Cuando se administra sulfato de serotonina a ratas hembras prepúberes disminuye la concentración de LH (Gallegos, 2007). Con base en estas evidencias y el incremento de serotonina observado en la hipófisis de los animales tratados con sulfato de serotonina es posible sugerir que la serotonina actúa en hipófisis modulando la secreción de gonadotropinas.

Existe también la posibilidad de que el sulfato de serotonina haya actuado directamente en el ovario, el incremento en la concentración de serotonina observado en los ovarios de los animales que recibieron sulfato de serotonina por vía sistémica permite pensar que esta amina además de acumularse en hipófisis también se acumula en la gónada y posiblemente participa en la modulación de la secreción de progesterona por el ovario. La posibilidad de que la serotonina participa en la modulación de la secreción de esteroides por la gónada ha sido mostrado en la rata macho (Tinajero, 1993). La menor concentración de testosterona observada en los animales tratados con sulfato de serotonina posiblemente es el producto de la menor concentración de progesterona, esteroide a partir del cual se sintetizan la testosterona (Gore-Langton y Armstrong, 1988).

La disminución en la concentración de DA observada en los animales que se trataron con sulfato de serotonina posiblemente es el resultado de la acción de la serotonina en fibras nerviosas que inervan al ovario (Ricu y col., 2008) o en células intraováricas que al parecer son una fuente de catecolaminas, como la noradrenalina. En relación a la DA se ha mostrado que en las células de la granulosa se encuentra el transportador de dopamina y noradrenalina (D'Albora y col., 2000; Greiner y col., 2008). Así mismo, por estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado en la médula del ovario de la rata la presencia de neuronas reactivas a tirosina hidroxilasa que es la enzima que participa en la transformación del aminoácido L-tirosina en diferentes catecolaminas como la noradrenalina y dopamina. Además se ha mostrado que en sistema nervioso central, la liberación de dopamina y noradrenalina es modulada por la serotonina al unirse a sus receptores distribuidos en el cuerpo de estas neuronas (Fink y Göthert, 2007).

La serotonina al unirse a sus receptores distribuidos en los vasos sanguíneos que irrigan a la gónada, actúa como un vasoconstrictor y provoca la disminución en el flujo sanguíneo hacia este órgano disminuyendo así el suministro de gonadotropinas y como consecuencia el estímulo para que se lleve a cabo la esteroidogénesis en el folículo. La activación de los receptores a serotonina 5-HT₁,

5-HT₂ y 5-HT₇ modifican el tono en las arterias y venas. En las arterias largas el principal receptor que estimula la contracción es el 5-HT_{2A}, mientras que, en venas es el 5-HT_{1B} (Linder y col 2007).

Con base en estudios farmacológicos se sugiere que en el ovario se encuentran receptores a serotonina (Amireault y Dubé, 2005). Es posible que la serotonina al unirse a sus receptores en las células foliculares desencadene una cascada de señalización que en conjunto con las gonadotropinas, participan en la modulación de la síntesis de hormonas esteroides en el ovario. La tendencia a la disminución en la concentración de estradiol en los animales que recibieron sulfato de serotonina por vía sistémica sacrificados a las 48 hrs posiblemente esta relacionada con la modificación de la actividad de la enzima aromatasas la cual es responsable de la aromatización de los andrógenos a estrógenos. Cortvrintd y Smitz (2002) mostraron que cuando a folículos de ratón mantenidos *in vitro* se adiciona arimidex, inhibidor de la enzima aromatasas al medio de cultivo, disminuye la concentración de estradiol en el medio de cultivo, La modificación en la actividad de esta enzima posiblemente es el resultado de la interacción de la serotonina con sus receptores en el propio ovario.

La disminución en la concentración de serotonina observada en el ovario de aquellos animales que recibieron KETA en bursa del ovario, se acompañó del incremento en su metabolito el 5-HIAA. Este hecho posiblemente es el resultado de que la KETA al unirse a los receptores 5-HT_{2A} impide la unión de la serotonina y que se incremente el metabolismo de la amina por la MAO. La idea de que la serotonina es sintetizada y degradada en el ovario es apoyada en la presencia de la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) y la MAO en el ovario (Ivanisević-Milovanović y col., 2003; Amireault y Dubé, 2005).

Tanaka y col., (1993) mostraron que la administración oral de ketanserina a la rata adulta en el día del proestro disminuye la concentración de estradiol en suero, lo que, coincide con lo observado en este estudio, en los animales inyectados en la

bursa. El efecto de la KETA en la síntesis de este esteroide posiblemente es resultado de la falta de interacción de la amina con el receptor 5-HT_{2A}, y se inhiba la cascada de señalización intracelular (Fig. 18). En las células del cumulus del ratón el estímulo de los receptores 5-HT_{2A} y 5-HT_{2B} acoplados a proteínas Gq estimula la liberación de Ca²⁺, esta liberación esta relacionada con la formación de AMPc en el ovocito así como en las células del cumulus (Amireault y Dubé, 2007)

A diferencia de los observado con KETA, en los animales que recibieron MESER no se modificó la concentración de serotonina en el ovario, pero sí disminuye el metabolito, lo que indica que cada tipo de receptor esta vinculado con la modulación de fenómenos diferentes.

La disminución en la concentración de progesterona y testosterona observada en aquellos animales tratados con KETA y S5-HT por vía sistémica, indica que al bloquearse el receptor 5-HT_{2A} la amina administrada vía sistémica y la endógena, actuaron sobre otros receptores los cuales regulan de manera inhibitoria la secreción hormonal. Es posible que el estímulo de estos receptores inhiba la producción de segundos mensajeros intracelulares (Barnes y Sharp, 1999), (Fig. 19) en las células de la teca y como consecuencia disminuye la actividad de los complejos enzimáticos que transforman el colesterol a progesterona y ésta a testosterona. Esto se apoya en los resultados de Amireault y Dubé (2005) quienes mostraron que al administrar diferentes agonistas a serotonina en un medio de cultivo donde se incubaron células del complejo cumulus de ratón la concentración de AMPc se incrementó.

En los animales que recibieron MESER en bursa la concentración de progesterona disminuyó posiblemente como producto de la acción del MESER, antagonista de los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2C} y 5-HT₁ (Schmidt y col., 1988; Rang y col., 2004). Es posible sugerir que el receptor 5-HT_{2C} es esencial para desencadenar la serie de eventos que llevan a la síntesis de progesterona y que la distribución de este receptor (5-HT_{2C}) se encuentre en mayor parte en células de la

teca donde se lleva a cabo la síntesis de esta hormona en el ovario (Fig. 20). La menor concentración de testosterona que se observó en estos animales posiblemente se debe a la disminución en la concentración de progesterona, sustrato a partir del cual se sintetiza esta hormona.

Es posible que la menor concentración de serotonina y su metabolito que se observó en la hipófisis de aquellos animales a los que se les administro KETA y S5-HT sea producto de la disminución en la concentración de progesterona y estradiol. Esta idea se apoya en el hecho de que se ha mostrado que las hormonas esteroides sexuales disminuyen la expresión de los genes que codifican para la enzima que participa en el metabolismo de la serotonina (MAO-A).

La disminución en la concentración de serotonina en el ovario de los animales que recibieron KETA y S5-HT sacrificados a las 24 lleva a pensar que la síntesis de esta amina se produce en el mismo ovario y que su acción en este órgano es mediada por el receptor 5-HT_{2A}. Sí se administran fármacos que inhiben la recaptura de serotonina en cultivos de células del complejo cumulus-ovocito en el ratón, se presenta una disminución en la expresión de la enzima triptófano hidroxilasa, y como consecuencia disminuye la síntesis de serotonina (Amireault y Dubé, 2005), lo cual apoyaría nuestra interpretación.

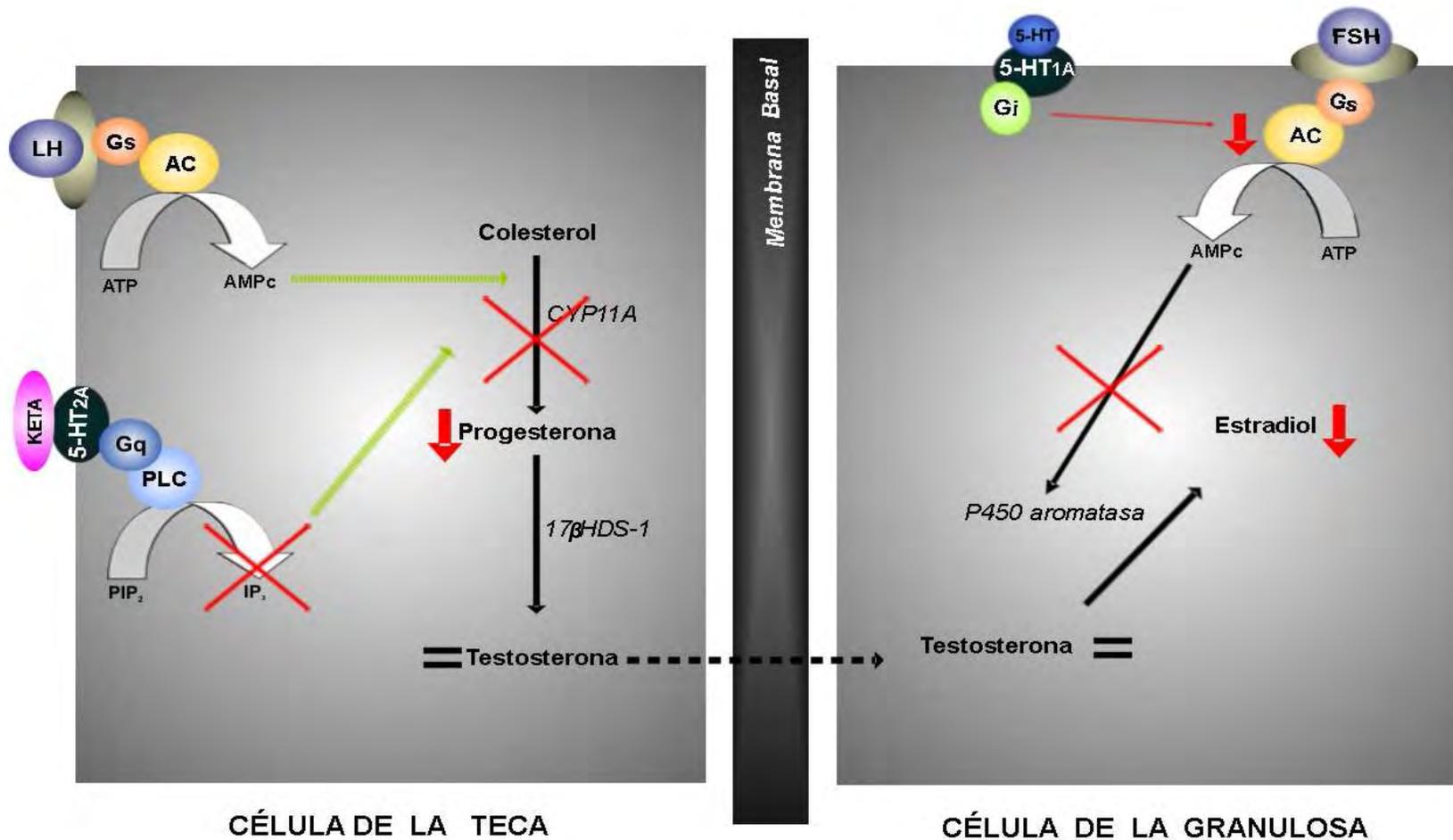


Fig. 18. Efecto del bloqueo del receptor a serotonina 5-HT_{2A}, mediante ketanserina (KETA) sobre la síntesis de hormonas esteroides en el ovario. Hormona luteinizante (LH); Hormona estimulante del folículo (FSH); Proteína Gs; Proteína Gi; Adenilato ciclasa (AC); Adenosin trifosfato (ATP); Adenosin monofosfato cíclico (AMPc); fosfolipasa C (PLC); bifosfato fosfatidinositol (PIP₂); inositol trifosfato (IP₃); P450ssc (CYP11A); 17β-hidriesteroide deshidrogenasa (17β-HSD-1); P450 aromatasa.

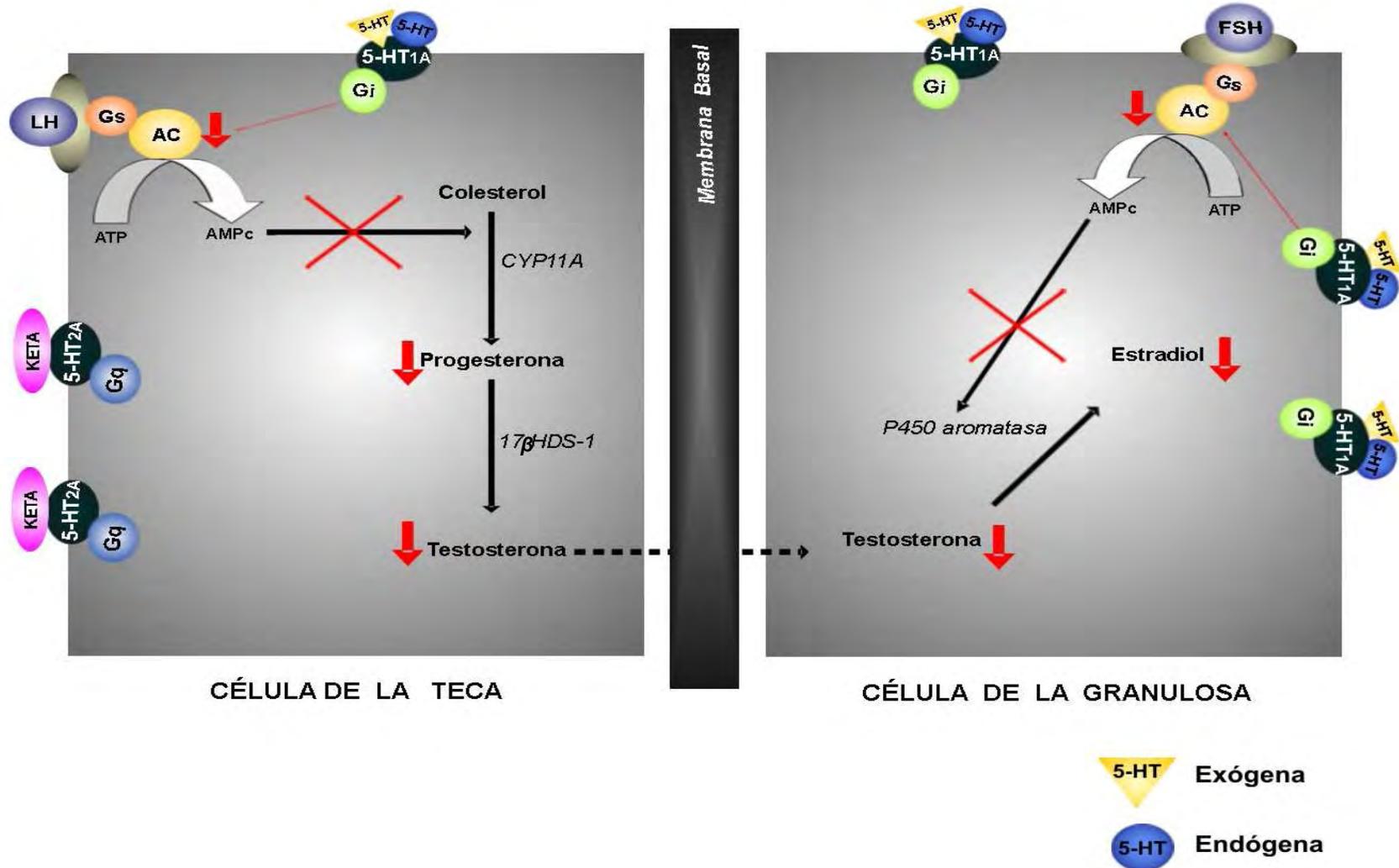


Fig. 19. Efecto del bloqueo del receptor a serotonina 5-HT_{2A}, mediante ketanserin (KETA) más la administración de sulfato de serotonina vía sistémica, sobre la síntesis de hormonas esteroides en el ovario. Hormona luteinizante (LH); Hormona estimulante del folículo (FSH); Proteína Gs; Proteína Gi; Adenilato ciclasa (AC); Adenosin trifosfato (ATP); Adenosin monofosfato cíclico (AMPc); P450ssc (CYP11A); 17β-hidriesteroide deshidrogenasa (17β-HSD-1); P450 aromatasa.

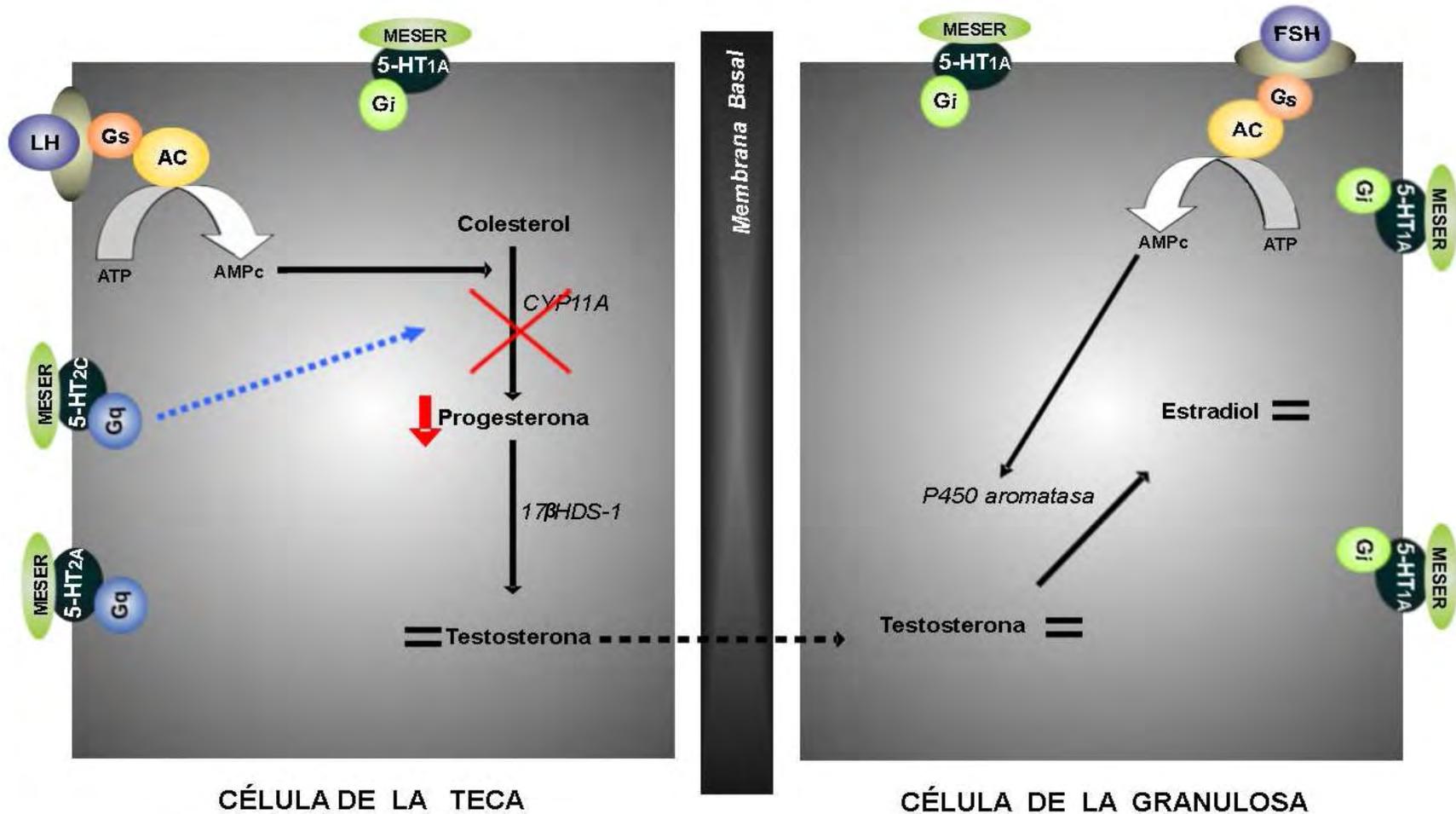


Fig. 20. Efecto del bloqueo de los receptores a serotonina 5-HT_{2C}, 5-HT_{2A}, y 5-HT_{1A}, mediante Metisergide (MESER) sobre la síntesis de hormonas esteroides en el ovario. Hormona luteinizante (LH); Hormona estimulante del folículo (FSH); Proteína Gs; Proteína Gi; Adenilato ciclase (AC); Trifosfato de adenosin (ATP); Adenosin monofosfato cíclico (AMPc); P450ssc (CYP11A); 17β-hidriesteroide deshidrogenasa (17β-HSD-1); P450 aromatasa.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este estudio proponemos que:

- ✘ En el animal prepúber la serotonina actúa en la hipófisis modulando la secreción de gonadotropinas y como consecuencia la secreción de esteroides por el ovario.
- ✘ En el animal prepúber la serotonina en el ovario regula de manera estimulante la secreción de progesterona y estradiol.
- ✘ El efecto de la serotonina en la secreción de hormonas esteroides por el ovario es mediado de manera diferencial por su unión a los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C}.

PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos en el presente trabajo surgen las siguientes preguntas:

- ✘ ¿Cuál es la distribución de los receptores a serotonina en el ovario de la rata desde el nacimiento hasta la etapa adulta?, y ¿cual es su función?
- ✘ ¿Además de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} existe otro tipo de receptor a serotonina presente en el ovario y que participe en la regulación de la esteroidogénesis?
- ✘ ¿El receptor 5-HT_{1A} funciona como un autorreceptor en células de la granulosa?
- ✘ ¿Como resultado del bloqueo de los receptores 5-HT_{1A}, 5-HT_{2A} y 5-HT_{2C} disminuye la actividad de las enzimas P450_{ssc} y aromatasa en el ovario?

BIBLIOGRAFÍA

Aguilar E, Ranchal A, Aguilar R, Pinilla L. (1993). Gonadotropin and prolactin secretion in prepubertal female rats treated with 8-hydroxy-2-(di-n-propylamino) tretalin. *Journal of Neural Transmission*, 94: 165-173.

Amireault P, Dubé F. (2005). Intracellular cAMP and Calcium Signaling by Serotonin in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes. *Molecular Pharmacology*, 68:1678–1687.

Arias P, Szwarcfarb B, Rondina DC, Carbone S, Sverdlik R, Moguilevsky 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: 57-61.

Barnes NM, Sharp T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38: 1083-1152.

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

Beck LR. (1972). Comparative observation on the morphology of the mammalian periovarial sac. *Journal of Morphology*, 136: 247–254.

Bethea CL, Lu NZ, Gundlah C, Streicher JM. (2002). Diverse Actions of Ovarian Steroids in the Serotonin. *Neural System Frontiers in Neuroendocrinology*, 23: 41–100.

Bódis J, Török A, Tinneberg HR, Hanf V, Harmori M, Cledon P. (1992). Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 57 (5): 1008-1011.

Chen NH, Reith MEA. (1995). Monoamine Interactions Measured by Microdialysis in the Ventral Tegmental Area of Rats Treated Systemically with (±)-8-Hydroxy-2-(Di-n-Propylamino) tetralin. *Journal of Neurochemistry*, 64(4): 1585-1597.

Clausell DE, Soliman KFA. (1977). Ovarian serotonin content in relation to ovulation. *Experientia*, 34(3):410-1.

Cortvrindt YHR, Smitz J. (2002). Effects of Aromatase Inhibition on In Vitro Follicle and Oocyte Development Analyzed by Early Preantral Follicle Culture. *Molecular Reproduction and Development*, 61: 549-559.

D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell and tissue research*, 300:47–56.

Díaz Véliz G, Dussaubat N, Mora S. (1997). Ketanserin effects on rat behavioral responses: modifications by the estrous cycle, ovariectomy and estradiol replacement. *Pharmacology Biochemical Behavior*, 57: 687-692.

Domínguez R, Cruz ME, Morán C. (1998). Differential effects of ovarian local anesthesia during pro-oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemi-ovariectomized adult rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 113: 185-190.

Donoso AO, Bishop W, Fawcett CP, Krulich L, McCann SM. (1971). Effects of Drugs that Modify Brain Monoamine Concentrations on Plasma Gonadotropin and Prolactin Levels in the Rat. *Endocrinology*, 89: 774-784.

Drucker R, (2005). *Fisiología Médica*. 1^{era} edición. El Manual Moderno, México. pp: 595, 596 y 606.

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

Eppig JJ, O'Brien M, Wigglesworth K. (1996). Mammalian Oocyte Growth and Development In Vitro. *Molecular Reproduction and Development*, 44: 260-273.

Erspamer V, Vialli M. (1937). Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. *Boll Soc Med-Chir Pavia*, 51: 357–363.

Finberg JPM, Youdim MBH. (1983). Selective MAO A and B Inhibitors: Their Mechanism of Action and Pharmacology, *Neuropharmacology*, 22(38):441-446.

Findlay JK., Drummond AE., Britt KL., Dyson M., Wreford NG., Robertson DM., Groome NP., Jones MEE., Simpson ER. (2000). The roles of activins, inhibins and estrogen in early committed follicles. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 163: 81–87.

Fink KB, Göthert M. (2007). 5-HT Receptor Regulation of Neurotransmitter Release. *Pharmacological Reviews*, 59(4): 360-417.

Frassetto A, Zhang J, Lao JZ, White A, Metzger JM, Fong TM, Chen RZ. (2008). Reduced sensitivity to diet-induced obesity in mice carrying a mutant 5-HT6 receptor. *Brain Research*, pp 140 – 144.

Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G. (2000). Prolactin: Structure, Function, and Regulation of Secretion. *Physiological Reviews*, 80(4): 1523-1631.

Gallegos E. (2007). Participación de la serotonina en los mecanismos que regulan el proceso de atresia y apoptosis en el ovario de la rata durante la etapa prepuberal. Tesis de Maestría, Maestro en Ciencias Biológicas, UNAM. pp 87.

Geneser F. (2000). Histología Sobre las bases biomoleculares. 3^{ra} edición, Editorial Medica Panamericana, Argentina. pp 614-623.

Goldman L, Ausiello DA. (2008). Cecil Medicine. 23^{ra} Edición. Saunders Elsevier, USA. pp: 3120.

Gore-Langton RE, Armstrong DT. (1988). Follicular Steroidogenesis and its Control En: The Physiology of Reproduction. E. Knobil y JD Neill (Eds). 2^{da} Edición. Raven Press, New York. pp 331-385.

Gouveia EM, Rodrigues CF. (2004). Involvement of serotonin 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion. Brain Research Bulletin, 63: 243-251.

Graveleau C, Paust HJ, Schmidt-Grimminger D, Mukhopadhyay AK. (2000). Presence of a 5-HT₇ Receptor Positively Coupled to Adenylate Cyclase Activation in Human Granulosa-Lutein Cells. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, 85(3): 1277-1286.

Greenwald GS, Terranova PF. (1988). Follicular Selection and its Control En: The Physiology of Reproduction. E. Knobil y JD Neill (Eds). 2^{da} Ed. Raven Press, New York. pp 387-445.

Greiner M, Paredes A, Rey-Ares V, Saller S, Mayerhofer A, Lara HE. (2008). Catecholamine Uptake, Storage, and Regulated Release by Ovarian Granulosa Cells. Endocrinology, 149(10):4988–4996.

Héry, M.; François-Bellan, AM.; Héry, f.; Deprez, P.; Becquet, D. (1997). Serotonin directly stimulates luteinizing hormone-releasing hormone release from GT1 cells via 5-HT₇ receptors. Endocrine, 7: 261-265.

Hsueh AJW, Billig H, Tsafriiri A. (1994). Ovarian Follicle Atresia: A Hormonally Controlled Apoptotic Process. *Endocrine Reviews*, 15 (6): 707-724.

Ivanisević-Milovanović OK, Demajo M, Petrović V, Cvijić G. (2003). Total monoamine oxidase activity in the hypothalamus, ovary and uterus of rats with an extreme number of ovarian corpora lutea. *Acta Physiologica Hungarica*, 90(4):319-25.

Jahn GA, Deis RP. (1988). Effect of serotonin antagonists on prolactin and progesterone secretion in rats: evidence that the stimulatory and inhibitory actions of serotonin on prolactin release may be mediated through different receptors. *Journal of Endocrinology*, 117: 415-422.

Jennes L., Beckman WC., Stumpf WE., Grzanna R. (1982). Anatomical Relationships of Serotonergic and Noradrenalinergic Projections with the GnRH System in septum and Hypothalamus. *Experimental Brain Research*, 46: 331-338.

Johns MA, Azmitia EC, Krieger DT. (1982). Specific *in Vitro* Uptake of Serotonin by Cells in the Anterior Pituitary of the Rat. *Endocrinology*, 110 (3): 754-760.

Justo SN, Rossano GL, Szwedfarb 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: 382-386.

Kaipia A, Hsueh AJW. (1997). Regulation of Ovarian Follicle Atresia. *Annual Review of Physiology*, 59:349-63.

Kandel ER, Schwartz JH, Jessell TM. (1991). *Principles of Neural Science*. 3^{ra} edition, Edit. Elsevier Science Publishing Co. Inc, USA. pp 1055-1056.

Kerdelhué B., Bojda F., Lesieur P., Pasqualini C., El Abed A., Lenoir V., Douillet P., Chiueh MC., Palkovits M. (1989). Median Eminence Dopamine and Serotonin Neuronal Activity. *Neuroendocrinology*, 49: 176-180.

Kronenberg HM, Melmed S, Polonsky KS, Larsen PR. (2008). *Williams Textbook of Endocrinology*. 11^{ra} Edición. Saunders Elsevier, Canada. pp: 1936.

Li M, Zhou TH, Gao Y, Zhang N, Li JC. (2007). Ultrastructure and Estrogen Regulation of the Lymphatic Stomata of Ovarian Bursa in Mice. *The Anatomical Record*, 290:1195-1202.

Linder AE., Ni W., Diaz JL., Szasz T., Burnett R., Watts SW. (2007). Serotonin (5-HT) in veins: Not All in vain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343: 415-421.

Lu NZ, Bethea CL. (2002). Ovarian Steroid Regulation of 5-HT_{1A} Receptor Binding and G protein Activation in Female Monkeys. *Neuropsychopharmacology*, 27(1):12-24.

Magoffin DA. (2005). Ovarian theca cell. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 37: 1344–1349.

Martin GG, Sack M, Talbot P. (1981). Structure of bursae ovaricae surrounding the ovaries of golden hamster. *The Anatomical record*, 201(3):485-98.

Murray RK, Granner DK, Mayes PA, Rodwell VW. (1994). *Bioquímica de Harper*. 13^{ra} edición. El Manual Moderno, México. 645-653.

Murray RK, Granner DK, Rodwell VW. (2007). *Harper Bioquímica Ilustrada*. 17^a edición, Manual Moderno, México. pp 487-502.

Nunez EA, Gershon MD, Silverman J. (1981). Uptake of 5-Hydroxytryptamine by Gonadotrophs of the Bat's Pituitary: A Combined Immunocytochemical Radioautographic Analysis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29(11): 1336-1346.

Oades RD, Halliday GM. (1987). Ventral tegmental (A10) system: neurobiology. 1. Anatomy and connectivity. *Brain Research Reviews*, 12: 117- 165.

Ojeda SR, Urbanski HF. (1988). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD Neill (Eds). 2^{da} Ed. Raven Press, New York. pp 1699-1737.

Palkovits M, Mezey E, Chiueh CG, Krieger DT, Gallatz K, Brownstein MJ. (1986) Serotonin-containing elements of the rat pituitary intermediate lobe. *Neuroendocrinology*, 42: 522-525.

Payette RF, Gershon MD, Nunez EA. (1985). Serotonergic Elements of the Mammalian Pituitary. *Endocrinology*, 116(5): 1933-1941.

Porter RHP, Benwell KR, Lamb H, Malcolm CS, Allen NH, Revel DFI, Adams DR, Sheardown MJ. (1999). Functional characterization of agonists at recombinant human 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT_{2C} receptors in CHO-K1 cells. *British Journal of Pharmacology*, 128: 13 – 20.

Rang HP., Dale MM., Ritter JM., Moore PK. (2004). *Farmacología*. 5^{ta} edición. Edit. Elsevier. España. pp 184-188.

Rapport MM, Green AA, Page IH. (1948). Serum vasoconstrictor (serotonin) iv. Isolation and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 176(3):1243-51.

Ricu M, Paredes A, Greiner M, Ojeda SR, Lara HE. (2008). Functional Development of the Ovarian Noradrenergic Innervation. *Endocrinology*, 149(1):50–56.

Rose FA, Bleszynski WS. (1971). The Metabolism of 5-Hydroxytryptamine O[35S]-Sulphate in the Rat. *The Biochemical Journal*, 122: 601-603.

Ross MH, Gordon IK, Wojciech P. (2004). *Histología (texto y atlas color con biología celular y molecular)*. 4^{ta} edición. Edit Editorial Médica Panamericana, Argentina. pp 730-736.

Saland LC, Samora A, Sanchez P, Chavez G. (1993). Immunocytochemical Studies of Tryptophan Hydroxylase, Tyrosine Hydroxylase and Serotonin Innervation in the Aged Rat Neurointermediate Pituitary. *Experimental Neurology*, 121: 119-126.

Schaeffer HJ, Sirotkin AV. (1997). Melatonin and serotonin regulate the release of insulin-like growth factor-I, oxytocin and progesterone by cultured human granulosa cells. *Experimental and clinical endocrinology and diabetes*, 105(2): 109-12.

Schmidt G, Kannisto P, Owan C, Sjöberg NO. (1988). Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused *in vitro*? *Acta Physiol Scand*, 132: 251-256.

Shannon N.J, Moore K.E. (1987)^a. Determination of the source of 5-hydroxytryptaminergic neuronal projections to the neural and intermediate lobes of the rat pituitary gland through the use of electrical stimulation and lesioning experiments. *Brain Research*, 416: 322-33.

Shannon NJ, Moore KE. (1987)^b. 5-Hydroxytryptamine is synthesized in neurons terminating in the neural and intermediate lobes of the rat pituitary gland. *Brain Research*, 402:287-292.

Sirotkin AV, Makarevich AV, Kotwica J, Marnet PG, Kwon HB, Hetenyi L. (1998). Isolated porcine ovarian follicles as model for the study of hormone and growth factor action on ovarian secretory activity. *Journal of Endocrinology*, 159: 313-321.

Smith MJ, Jenness L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction*, 122: 1-10.

Tanaka E, Baba N, Toshida K, Suzuki K. (1993). Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. *Life Sciences*, 53: 563-570.

Tinajero JC, Fabri A, Ciocca DR, Dafau ML. (1993), Serotonin secretion from Rat Leydig Cells. *Endocrinology*, 136(6): 3026-3029.

Van de Kar LD, Raap DK, Battaglia G, Muma NA, Garcia F, DonCarlos LL. (2002). Treatment of cycling female rats with fluoxetine induces desensitization of hypothalamic 5-HT_{1A} receptors with no change in 5-HT_{2A} receptors. *Neuropharmacology*, 43: 45–54.

Vanderhyden BC, Rouleau A, Armstrong DT. (1986). Effect of removal of the ovarian bursa of the rat on infundibular retrieval and subsequent development of ovulated oocytes. *Journal of reproduction and fertility*, 77:393–399.

Vanhatalo, S, Soinila S, Kaartinen K, Bäck, N. (1995). Colocalization of dopamine and serotonin in the rat pituitary gland and in the nuclei innervating it. *Brain Research*, 669: 275-284.

Vega Matuszyk J, Larsson K, Eriksson E. (1998). The Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Fluoxetine Reduces Sexual Motivation in Male Rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 60(2): pp. 527–532.

Vitale ML, Chiocchio SR. (1993). Serotonin, a Neurotransmitter Involved in the Regulation of Luteinizing Hormone Release. *Endocrine Reviews*, 14(4): 480-493.

Vitale ML, Parisi MN, Chiocchio SR, Tramezzani JH. (1986). Serotonin induces gonadotrophin release through stimulation of LH-releasing hormone release from the median eminence. *Journal of Endocrinology*, 111: 309-315.

Von Bohlen O, Dermietzel R. (2006). *Neurotransmitters and Neuromodulators (handbook of receptors and biological effects)*. 2^{da} edition. Edit. Wiley-Vch Verlag GmbH & Co. KgaA. Weinheim, Germany. pp 132 y 133.

Wickings EJ, Hillier SG, Reichert LE. (1986). Gonadotrophic control of steroidogenesis in human granulosa-lutein cells. *Journal of Reproduction and Fertility*, 76: 677-684.

Yen SSC, Jaffe RB, Barbieri RL. (2001). *Endocrinología de la reproducción, Fisiología, Fisiopatología y manejo clínico*. 4^{ta} edición. Editorial Médica Panamericana, Argentina. pp 165-202.

Apéndice 1

Cuantificación de Hormonas Esteroides

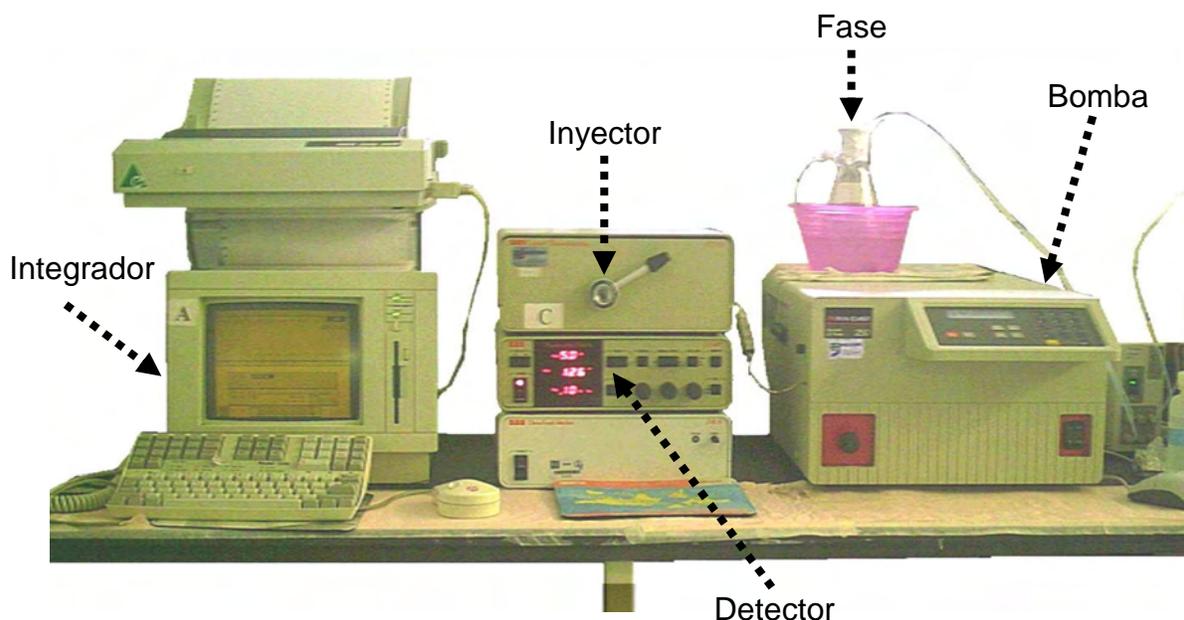
Para la cuantificación de hormonas esteroides se utilizó una curva patrón para cada hormona que se construyó con base en diferentes concentraciones:

Concentración	Progesterona ng/ml de suero	Testosterona pg/ml de suero	Estradiol pg/ml de suero
Sensibilidad del método	0.02 ng/ml	4 ng/ml	8 pg/ml
Coeficiente			
Intraensayo	4.3%	8.1%	7.2%
Interensayo	7.8%	4.1%	8.5%
A	0	0	0
B	0.1	0.2	20
C	0.5	0.5	50
D	2	1.0	150
E	10	4.0	500
F	20	8.0	1800
G	40	16.0	3600

Apéndice 2

Cuantificación de Serotonina y Catecolaminas

Se prepararon soluciones stock de serotonina, ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), noradrenalina (NA), ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3, 4-dihidroxifenilacetico (DOPAC), 0.1, 0.5 y 1 ng que se inyectaron al equipo de cromatografía. Se construyó una curva patrón con estas concentraciones, posteriormente se calibró el equipo de cromatografía de líquidos, La concentración de serotonina, catecolaminas y de sus respectivos metabolitos se calculó comparando el área bajo la curva de los diferentes picos correspondiente a cada neurotransmisor con la curva de calibración. La concentración de los diferentes neurotransmisores se expresó en ng/mg de tejido.



Fotografía del equipo de cromatografía de líquidos de alta resolución