



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE 5-
HIDROXITRIPTÓFANO EN LA SECRECIÓN DE
PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN LA RATA
HEMERA PREPÚBER

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

PRESENTA:

OMAR DAVID CORTÉS PRIETO

DIRECTORA: Dra. María Elena Ayala Escobar



MÉXICO, D.F.

JUNIO, 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 5-HIDROXITRIPTOFANO EN LA
SECRECIÓN DE PROGESTERONA Y ESTRADIOL EN LA RATA HEMBRA
PREPÚBER

Tesis que para obtener el título de biólogo presenta: Omar David Cortés Prieto.

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-PAIIT Convenio IN-219408

AGRADECIMIENTOS

Agradezco de manera muy, pero muy especial a la Dra. María Elena Ayala Escobar por todo el apoyo, comprensión y conocimiento que me dio para la realización de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. María Elena Ayala Escobar

M. C. Raúl Zavala Chavero

Dra. Leticia Morales Ledesma

M en IBSH. Angélica Flores Ramírez

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

A los compañeros del laboratorio Diana, Juanita, Jessica, Daniel, Maritza, Andrea, Eloir por su ayuda, amistad y por el tiempo que me dieron.

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

A la Universidad Nacional Autónoma de México por la formación y la educación que obtuve de ella y los bellos momentos que viví aquí.

DEDICATORIAS

Mmm... Pues esta creo que es la parte más difícil de la tesis, pero empezare ahora...

A ti Mamá (o séase), a ti Guadalupe por todo lo que me diste, enseñaste y sacrificaste por este pequeño vago, tu eres lo que me inspira a seguir adelante a caerme y levantarme y ser siempre mejor de lo que fui el día anterior, **TE AMO MUCHISIMO MAMA!!!**

A ti Nayely (Mugrovich), por que obviamente sin ti no estaría ni seria como soy, eres mi carnala, gracias por esos momentos de dispersión ya que en estos tiempos de seriedad me mantuvieron cuerdo, por ser siempre la banda, claro que **TE AMO ERES LA BANDA!!!**

A mi Papá (Leonardo), claro que de ti aprendí que siempre uno debe ir hacia delante, nunca para atrás, siempre para adelante, tu también eres gran parte de lo que soy ahora y obviamente a ti también **TE AMO!!!**

A mi abuelita que siempre no se como, pero lo hace me saca una sonrisa, por los gratos momentos que me da, mi estomago y yo se lo agradecemos enormemente, me enseñó que el querer sacar algo o alguien adelante es cuestión de querer, gracias por todo lo que nos consiente y nos apapacha la quiero muchote, pues Ud. es mi Abuela!!!

A mis tías (tratare de ponerlas en orden descendente OK): Tía Elvira, me enseñaste que siempre uno debe darse un tiempo de relajarse, obviamente después de trabajar ya que así saben mejor, Tía Silvia, por enseñarme que uno no se debe de rendir nunca que todo es posible superar y vencer, Tía Carmen, por enseñarme a que mis opiniones y creencias siempre estén bien definidas y por ayudarme a crear mi carácter, Tía Angelita, por enseñarme que uno puede hacer mil millones de cosas a la vez y por enseñarme palabras tan curiosas como "vaciado", a mis Tíos Marcos por enseñarme que todos podemos ser grandes en la vida, Tío Encarnación por alivianarme y ayudarme en toda mi vida y enseñarme cosas que siempre recordare, apreciare y me servirán para todo el tiempo que yo este aquí y Tío Quino por enseñarme que podemos ser cualquier cosa que queramos.

A mis primos Gustavo, Ivette, Itandehui, Joaquín, Quetzally, Marcos, Alberto, Ángel, Cesar, Nancy, Dhamar, Alondra, Daniel, Naomi y Paulina, nunca dejen de crecer, siempre aprendan de todo y todos y siempre estaré ahí para Uds. Son mi banda y yo siempre seré la suya nosotros siempre nos moveremos hacia adelante!!!

A ti MON (NOMN), porque eres una parte importantísima en mi vida y espero siempre lo seas, eres una de las personas que me motivo a seguir en esto y seguir adelante con lo mismo, Te voy a querer toda mi vida porque para bien estas en mi corazón y jamás te iras de EL!!! **Ti Quero Mucho!!!**

A Selene y Emilio malditos amigos que no van a venir, pero aún así son mis Brothers y siempre estarán en mi vida y serán parte de mi, los quiero!!!

A mi querida Ola Verde, Andy, Bali, Eve, Nube, Yess, Natasha, Chanfle, Ruso, Emily, Huguito, Verito, Peter, Pedro, Youknow, Itsmylive, Verdecita, Tomis, Joy, Homero's, Fabis, Lety, Pau, Viny, Primo, Sherpa, Mudo, Juan Diego, gracias por toda la diversión, risas, mofa y desestress que me dieron son la BANDOTA y para mí siempre lo serán!!!

A mis flores más rosas de todo Zaragoza que me ayudaron y me alegraron varios días cuando mas me hacia falta, Yessica, Chucho y Mariel, por alivianarme y hacerme reír en exceso gracias por esas salidas.

A mis ranferis Gaby, Tania, Alex, Baduel, Orejas, Flaco, Pollo, gracias por dejarme jugar no tan mal en su equipo, jajaja !!!

A aquellos que también me han ayudado y bastante, Tío Alfredo, Tío Joaquín, Tío Tito, Tío Gustavo y Miguel Ángel. Gracias por ayudarme.

A todos los de mi labo porque me enseñaron mucho, me toleraron mucho y de plano me aguantaron demasiado gracias, a todos Uds. Juanita, Dianita, Jessica, Daniel, Andrea, Maritza y a toda mi unidad, We Are The BEST!!!

A todos ustedes por estar conmigo, ayudarme a ser quien soy y como soy los quiero a todos!!! Nos veremos pronto en el desempleo!!!

GRACIAS A TODOS!!! ¡MONTA GRAZIE!

| | |
|---|-----------|
| RESUMEN | I |
| 1. INTRODUCCIÒN | 1 |
| 1.1 Triptofano | 1 |
| 1.2 Serotonina | 3 |
| 1.3 Historia de la Serotonina | 4 |
| 1.4 Sistema Serotoninérgico | 5 |
| 1.5 Síntesis de Serotonina..... | 5 |
| 1.5.1 Metabolismo de la Serotonina | 9 |
| 1.5.2 Funciones de la Serotonina | 10 |
| 1.6 Ovario..... | 11 |
| 1.7 Esteroidogénesis | 15 |
| 1.8 Serotonina y Funciones del Ovario | 18 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 21 |
| 3. HIPÓTESIS | 22 |
| 4. OBJETIVO GENERAL | 23 |
| 4.1 Objetivos Específicos | 23 |
| 5. MATERIAL Y MÉTODOS | 24 |
| 5.1 Análisis de los Efectos de la Administración del 5-hidroxitriptofano por Vía Sistémica..... | 24 |
| 5.2 Análisis de los efectos de la Administración de 5-Hidroxitriptofano en la Bursa del Ovario | 24 |
| 5.2.1 Procedimiento de Inyección en Bursa del Ovario | 25 |
| 5.3 Procedimiento de Autopsia | 26 |
| 5.3.1 Cuantificación de Hormonas | 26 |
| 5.4 Cuantificación de Neurotransmisores..... | 26 |
| 5.5 Análisis Estadístico | 27 |

| | |
|---|-----------|
| 6. RESULTADOS | 28 |
| 6.1 Efecto de la Administración del 5-Hidroxitriptofano por Vía Sistémica .. | 28 |
| 6.1.1 Concentración de 5-HT y 5-HIAA en Hipotálamo e Hipófisis | 28 |
| 6.1.2 Concentración de Gonadotropinas | 29 |
| 6.1.3 Concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el Ovario | 29 |
| 6.1.4 Concentración de Hormonas Esteroides..... | 29 |
| 6.2 Efecto de la Administración de 5-Hidroxitriptofano en Bursa del | |
| Ovario. | 37 |
| 6.2.1 Concentración de Gonadotropinas. | 37 |
| 6.2.2 Concentración de 5-HT y 5-HIAA en el Ovario. | 37 |
| 6.2.3 Concentración de Hormonas Esteroides..... | 40 |
| 7. DISCUSIÓN | 43 |
| 8. CONCLUSIONES | 48 |
| 9. BIBLIOGRAFÍA | 49 |
| Apéndice A | 60 |
| Apéndice B | 60 |

RESUMEN

La serotonina participa en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de las gonadotropinas hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH), las cuales en el ovario regulan el crecimiento y la diferenciación del folículo y la esteroidogénesis. También se sugiere que en el ovario la serotonina regula directamente la esteroidogénesis. Sin embargo, hasta el momento las evidencias que existen son contradictorias. Por ello en el presente estudio se analizaron los efectos del aumento de la serotonina por la administración del 5-hidroxitriptófano (precursor de la serotonina) por vía sistémica o directamente en la bursa del ovario sobre la secreción de progesterona, testosterona y estradiol y en la actividad del sistema serotoninérgico en el hipotálamo, hipófisis y ovario utilizando como modelo a la rata hembra prepúber (30 días de edad).

La administración de solución salina (Vh) no modificó ninguno de los parámetros evaluados. Para analizar los efectos de la administración del 5-hidroxitriptófano (5-HTP), se conformó un único grupo de comparación (TA+Vh, testigo). En comparación con el grupo testigo, en el hipotálamo anterior y medio de los animales que grupo que recibieron el 5-hidroxitriptófano por vía i.p. Se observó el incremento en la concentración de serotonina: hipotálamo anterior [60min, 0.61 ± 0.1 vs. 2.34 ± 0.34 ; 90min, 0.93 ± 0.15 vs. 1.48 ± 0.13 , $p < 0.05$] e hipotálamo medio [60min, 0.73 ± 0.06 vs. 2.34 ± 0.17 ; 90min, 2.43 ± 0.33 vs. 4.42 ± 0.31 , $p < 0.05$]. Este mismo comportamiento se observó en la concentración del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA).

En comparación con el grupo testigo el incremento en la concentración de 5-HT también se observó en la hipófisis [30min; 0.67 ± 0.08 vs. 3.12 ± 0.67 ; 60min; 1.04 ± 0.31 vs. 2.37 ± 0.45 ; 90min, 0.46 ± 0.07 vs. 1.36 ± 0.19 ; 120min, 0.54 ± 0.23 vs. 1.14 ± 0.12 , $p < 0.05$] y en el ovario [30min, 0.39 ± 0.04 vs.

10.57±0.9; 60min, 0.34±0.02 vs. 3.56±0.4; 90min, 0.69±0.05 vs. 2.03±0.17; 120min, 0.46±0.05 vs. 1.74±0.11, p<0.05] de estos animales

En los animales que se les administró por vía sistémica el 5-hidroxitriptófano, se observó una menor concentración de LH [60min, 0.2±0.03 vs. 0.09±0.01; 90min, 0.13±0.02 vs. 0.07±0.01; 120min, 0.11±0.01 vs. 0.05±0.008, p<0.05], una disminución en la concentración de FSH [30min, 3.38±0.26 vs. 2.75±0.09, p<0.05] ó el incremento en la misma [120min, 3.99±0.28 vs. 5.09±0.24, p<0.05], progesterona [30min, 8.73±1.94 vs. 23.41±3.79; 90min, 9.88±2.06 vs. 6.14±0.7, p<0.05], testosterona [30min, 0.09±0.01 vs. 0.13±0.009; 60min, 0.09±0.009 vs. 0.14±0.02; 120min, 0.07±0.01 vs. 0.05±0.006, p<0.05] y estradiol [30min, 9.12±1.36 vs. 14.55.52±1.52; 60min, 9.5±0.79 vs. 11.59±1.51; 120min 9.49±0.7 vs. 6.76±1.09, p<0.05].

En comparación con el grupo intacto, en los que recibieron solución salina en bursa del ovario, se observó el incremento significativo en la concentración de 5-HT y 5-HIAA en el ovario de los animales sacrificados a los 60 minutos [4.44±0.47 vs 0.38±0.04, p<0.05]. Este mismo comportamiento se observó en los animales que se les inyectó el 5-hidroxitriptófano [0.38±0.04 vs. 5.6±0.64p<0.05]. A los 120 minutos este comportamiento se observó únicamente en los animales tratados con el precursor [1.07±0.13vs. 0.43±0.04, p<0.05].

En los animales que recibieron Vh o 5-hidroxitriptófano en bursa del ovario y se sacrificaron a los 60 minutos, la concentración de progesterona fue mayor que el grupo intacto [11.59±1.71 (intacto) vs. 24.26±2.14 (Vh), 27.26±2.47 (5-HTP), p<0.05] y menor concentración de estradiol.

Con base en los resultados obtenidos se sugiere que la serotonina actúa directamente en el ovario y que regule de forma estimulante la modulación de la secreción de progesterona, testosterona y estradiol en la hembra prepúber.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Triptofano

El L-triptofano es uno de los diez aminoácidos esenciales conocidos, es ingerido como parte de la dieta y fue descubierto por Hopkin y colaboradores en 1901. Es un aminoácido aromático, apolar y lo conforma un anillo indólico en la cadena lateral con capacidad de establecer enlaces débiles con estructuras semejantes, por lo cual se clasifica como un aminoácido hidrofóbico (figura 1). Este aminoácido esencial es necesario para la biosíntesis de proteínas estructurales y funcionales y es el principal precursor de la síntesis de la serotonina (5-HT), melatonina y de la vitamina niacina. La síntesis de la niacina a partir del triptofano es regulada hormonalmente (Index Merck, 2005).

El triptofano es el único aminoácido que se une a la albúmina del plasma y existe un equilibrio entre la forma unida y libre en la circulación periférica (McMenamy, 1965). Casi el 90 % del triptofano total en el plasma se une a la albúmina y forma un complejo que no cruza la barrera hematoencefálica (Madras y col., 1974). El triptofano libre tiene la propiedad de cruzar la barrera (Carretti y col., 2007). Cuando el aminoácido se encuentra en el fluido extracelular o fluido cerebroespinal, está disponible y es capturado por las células del sistema nervioso (Ruddick y col., 2006).

Un factor que determina la relación triptofano libre/triptofano unido es la concentración de ácidos grasos no esterificados en sangre, los cuáles también tienen la capacidad de unirse a la albúmina y desplazar al triptofano de su sitio de unión (Curzon y col., 1973; Chaouloff y col., 1986). Algunos factores exógenos también inducen el desplazamiento del triptofano de la albúmina, entre los que se encuentran algunas drogas, como la benzodiazepina (Müller y Wollert, 1975).

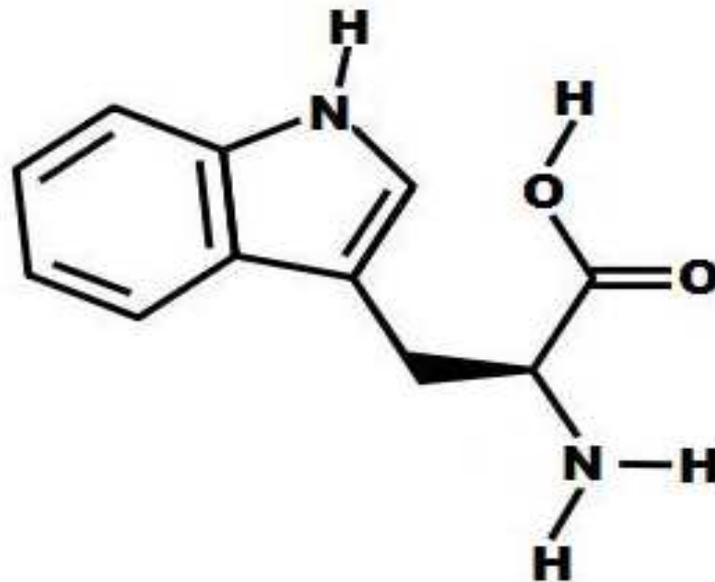


Figura 1.- Estructura del Triptofano (modificado de Green, 2006).

Existe controversia sobre si la concentración del triptofano total en plasma o del triptofano libre es lo que determina la tasa de incorporación de este aminoácido en el cerebro (Fernstrom y Fernstrom, 2006). En relación a esto se mostró que un factor que regula la incorporación del triptofano al cerebro, es la disociación del aminoácido de la albúmina. El triptofano es transportado de la circulación a través de la barrera hematoencefálica por un transportador que está conformado por varios aminoácidos neutros entre los que se encuentran la tirosina, fenilalanina, isoleucina, leucina y valina (Fernstrom, 1983).

Una vez que el triptofano ha cruzado la barrera hematoencefálica, se encuentra en su forma libre y se incorpora a las células del sistema nervioso central y entra a diferentes rutas metabólicas como son: 1) la síntesis de proteínas en todas las células; 2) síntesis de serotonina en las neuronas serotoninérgicas o mastocitos; 3) producción de melatonina en los pinealocitos; entre otras (figura 2) (Ruddick y col., 2006).

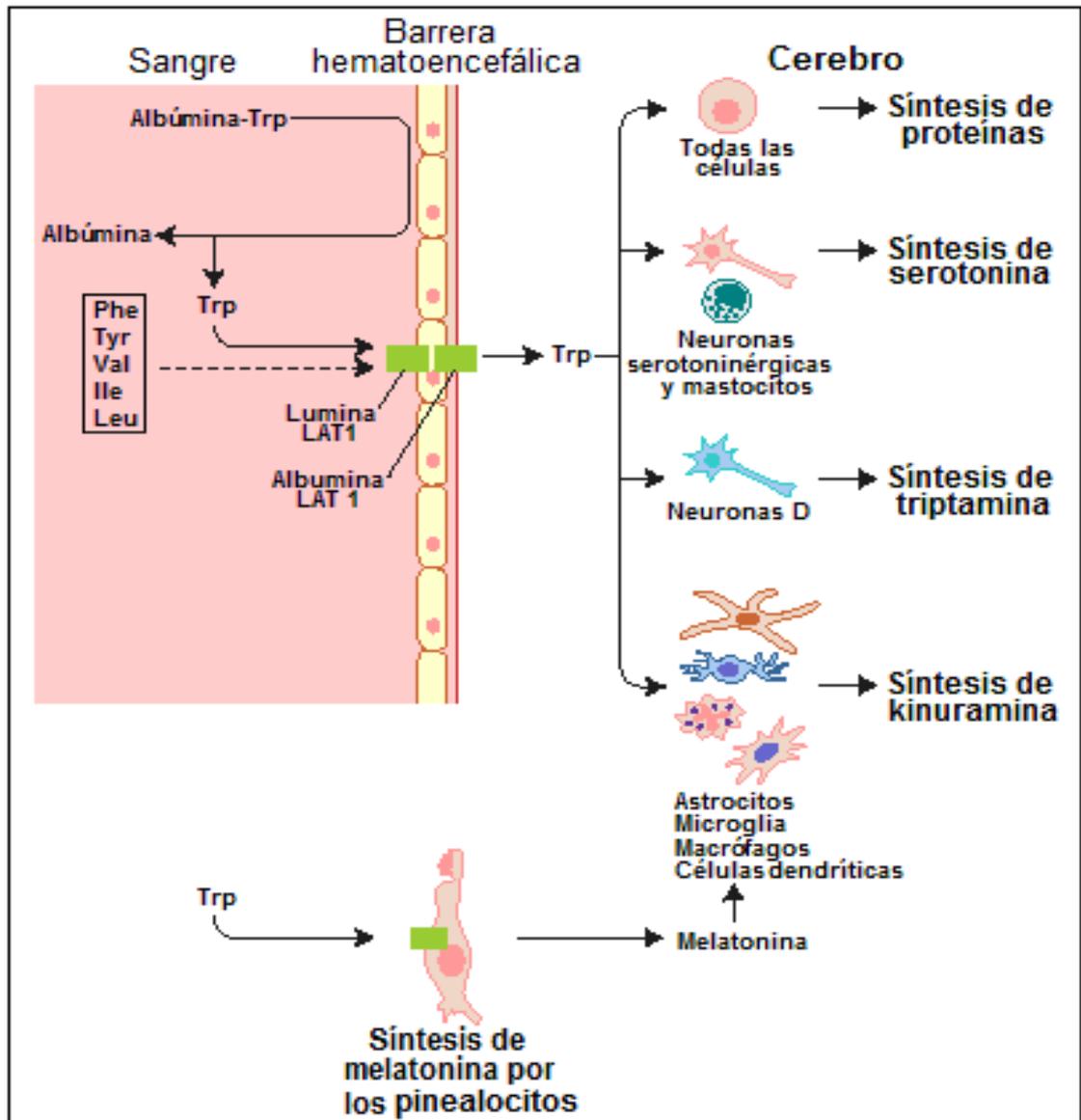


Figura 2.- Metabolismo del triptofano en el sistema nervioso central (modificado de Ruddick y col., 2006).

1.2 Serotonina

La serotonina (5-HT), es una monoamina que se sintetiza en las neuronas serotoninérgicas del sistema nervioso central y en las células enterocromafines del tracto gastrointestinal de los animales y del ser humano. También se le encuentra en los hongos, plantas, frutas y en vegetales (Index Merck, 2005).

1.3 Historia de la Serotonina

La identificación, el aislamiento y la caracterización de la serotonina se realizó entre 1940 y 1949. Antes de que se conociera como serotonina esta sustancia ya era objetivo de muchas investigaciones y diferentes grupos trataban de identificarla. A finales de la década de los 40, Page y col., (1940) aislaron y caracterizaron una sustancia del suero que producía vasoconstricción y la denominaron enteramina (Miura y col., 2008). En Italia, Erspamer (Erspamer y Asero, 1952) identificó esta misma sustancia en los constituyentes de la mucosa gástrica de mamíferos y las secreciones de las glándulas de los pulpos (Green, 2006).

Rapport, Green, y Page, en 1948 aislaron y nombraron a esta sustancia por primera vez con el término serotonina, que hace referencia a que se identificó por primera vez en el suero (Green, 2006). Esta sustancia posteriormente se identificó químicamente por Rapport, como 5-hidroxitriptamina (5-HT) (figura 3) (Fink y Göthert, 2007). La identificación de la amina permitió que se iniciara su síntesis en los laboratorios de las compañías Upjohn y Abott en Estados Unidos de Norteamérica (Green, 2006). En la actualidad se ha mostrado que la serotonina se encuentra implicada en la regulación de diferentes funciones, se le asocia con algunos desórdenes psicológicos y se le describen efectos terapéuticos, como en el tratamiento de la depresión y la ansiedad (Donnersberger y Lesak, 2002).

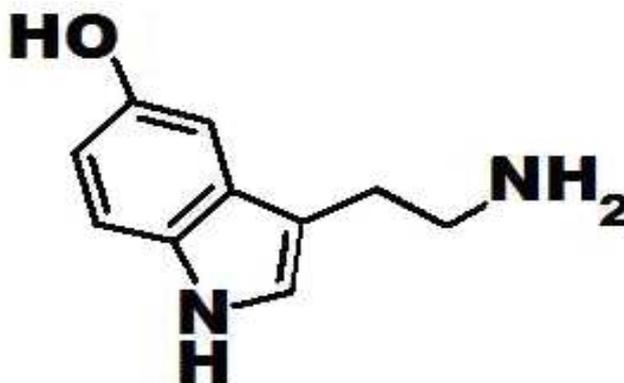


Figura 3.- Estructura de la Serotonina (modificado de Green, 2006).

1.4 Sistema Serotoninérgico

Dahlstrom y Fuxe, (1948) por medio de técnicas de histofluorescencia observaron grupos de células que se localizaban en el cerebro medio y que se denominaron núcleo del rafé (Green, 2006). Este núcleo es un conjunto de nueve paquetes de neuronas que se localizan alrededor de la formación reticular. Los axones de estas neuronas inervan diferentes regiones del encéfalo, como son el hipotálamo, la amígdala, el locus ceruleus y la corteza cerebral (Fink y Göthert, 2007). Así mismo, se le identifican en la médula espinal. En el hipotálamo estas terminales serotoninérgicas se les localiza en el área hipotalámica anterior, en los núcleos arcuato y paraventricular, así como en la eminencia media (figura 4) (Fink y Göthert, 2007).

1.5 Síntesis de Serotonina

La serotonina se sintetiza a partir del aminoácido triptofano (Ruddick y col., 2006). Dos enzimas participan en la transformación del triptofano a serotonina: la triptofano hidroxilasa (TPH) y la L-aminoácido aromático descarboxilasa (DDC) (Nishizawa y col., 1996). La TPH es la enzima limitante en la síntesis y estimula la transformación del triptofano en 5-hidroxitriptofano (5-HTP). La TPH utiliza hierro (Fe^{2+}) como cofactor y oxígeno (O_2) y tetrahidrobiopterina (BH4) como cosubstrato para hidroxilar el triptofano (5-HTP). El 5-hidroxitriptofano se transforma en serotonina por la acción de la enzima DDC (figura 5) (Fernstrom, 1983; Walther y col., 2003).

La serotonina es liberada a la hendidura sináptica y se une a su receptor en la neurona presináptica, en donde desencadena una cascada de señalización que culmina con la activación de la neurona postsináptica (figura 6) (Huang y col., 2005).

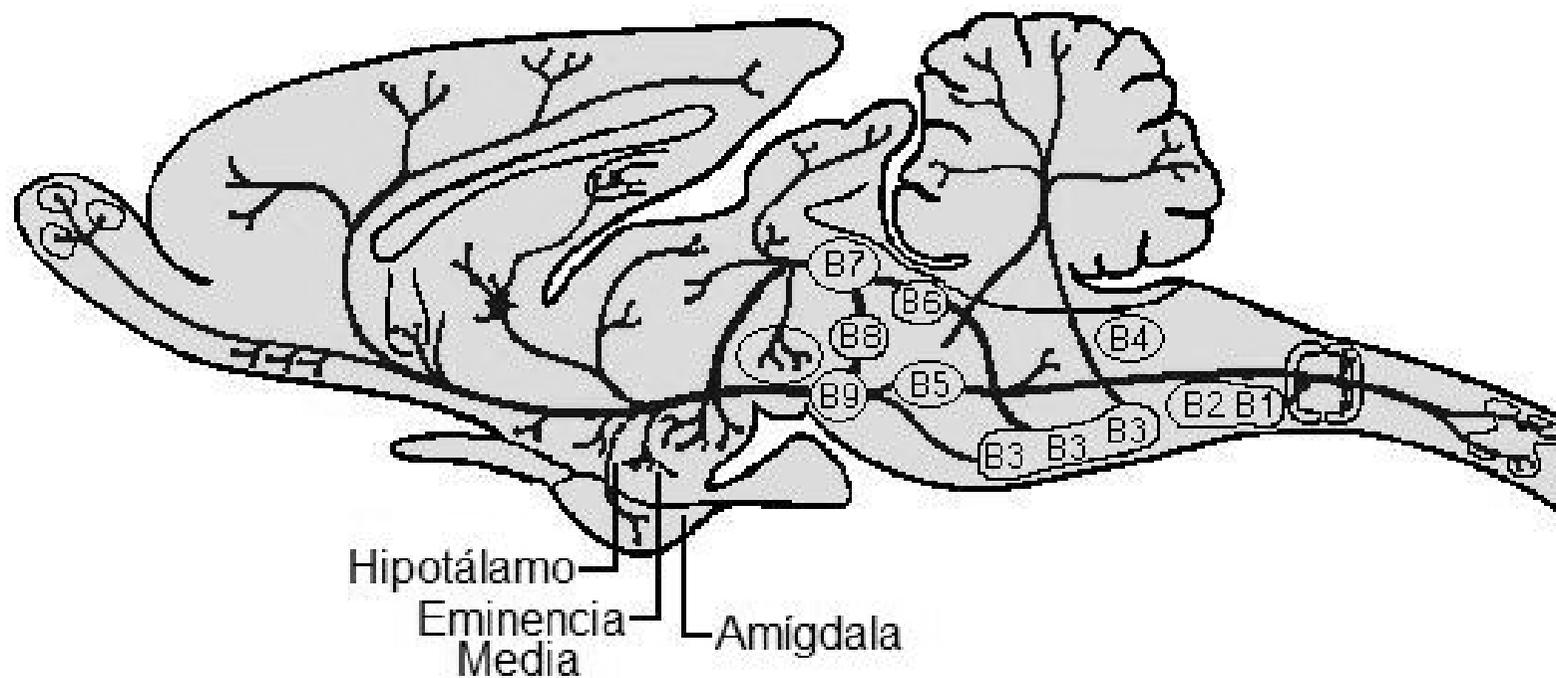


Figura 4.- Esquema de un corte sagital del cerebro de ratona en el que se muestra la ubicación de los grupos de neuronas serotonérgicas (desde B1 a B9) que conforman al núcleo del rafé; así como la proyección de sus fibras a diferentes regiones del cerebro (modificado de Frazer y Hensler, 1999)

Inicialmente se pensaba que el triptofano era hidroxilado por la tirosina hidroxilasa, pero en 1964 Grahame-Smith aisló y caracterizó a la enzima triptofano hidroxilasa de tumores carcinoides y en el tejido cerebral. Posteriormente Kon y Weissman en 1966, mostraron que cuando se administra la p-clorofenilalanina (PCPA), un inhibidor específico de la TPH, disminuye en el cerebro en un 80 % la concentración de serotonina, debido a que esta amfetamina inhibe a la TPH, y la hidroxilación del triptofano es el paso limitante en la síntesis de la amina (Green, 2006). En la glándula pineal, la serotonina es un intermediario en la producción de melatonina y en esta glándula se encuentran altas concentraciones de TPH (Walther y Bader, 2003).

La TPH no es saturada por su substrato y si el consumo de triptofano es alto se incrementa la síntesis de serotonina en el cerebro (Young y Teff, 1989). Esto llevó a algunos investigadores a preguntarse si: ¿Existe algún mecanismo que controle la concentración de triptofano cerebral?. Diferentes aminoácidos compiten con el triptofano por su transporte al sistema nervioso central, además, de los aminoácidos esenciales, el triptofano es menos abundante en el organismo. Con base en esta información se decidió analizar en la rata los efectos de proporcionar una dieta rica en tirosina y baja en triptofano y observaron que la restricción de triptofano en la alimentación se acompaña de la disminución en la concentración de serotonina en el cerebro (Green, 2006).

Se han identificado dos isoformas de TPH: TPH1, que se encuentra en diferentes tejidos periféricos como el ovario, y la TPH2, que es una isoforma específica del cerebro (Nakamura y Col., 2006). TPH1 y TPH2 son dos holoenzimas tetraméricas que presentan un 71% de homología en la secuencia de aminoácidos en humanos, rata y ratón (Walther y Bader 2003). También presentan diferencias moleculares que posiblemente se asocian a las variaciones en sus propiedades bioquímicas y funcionales (Walther y Bader 2003).

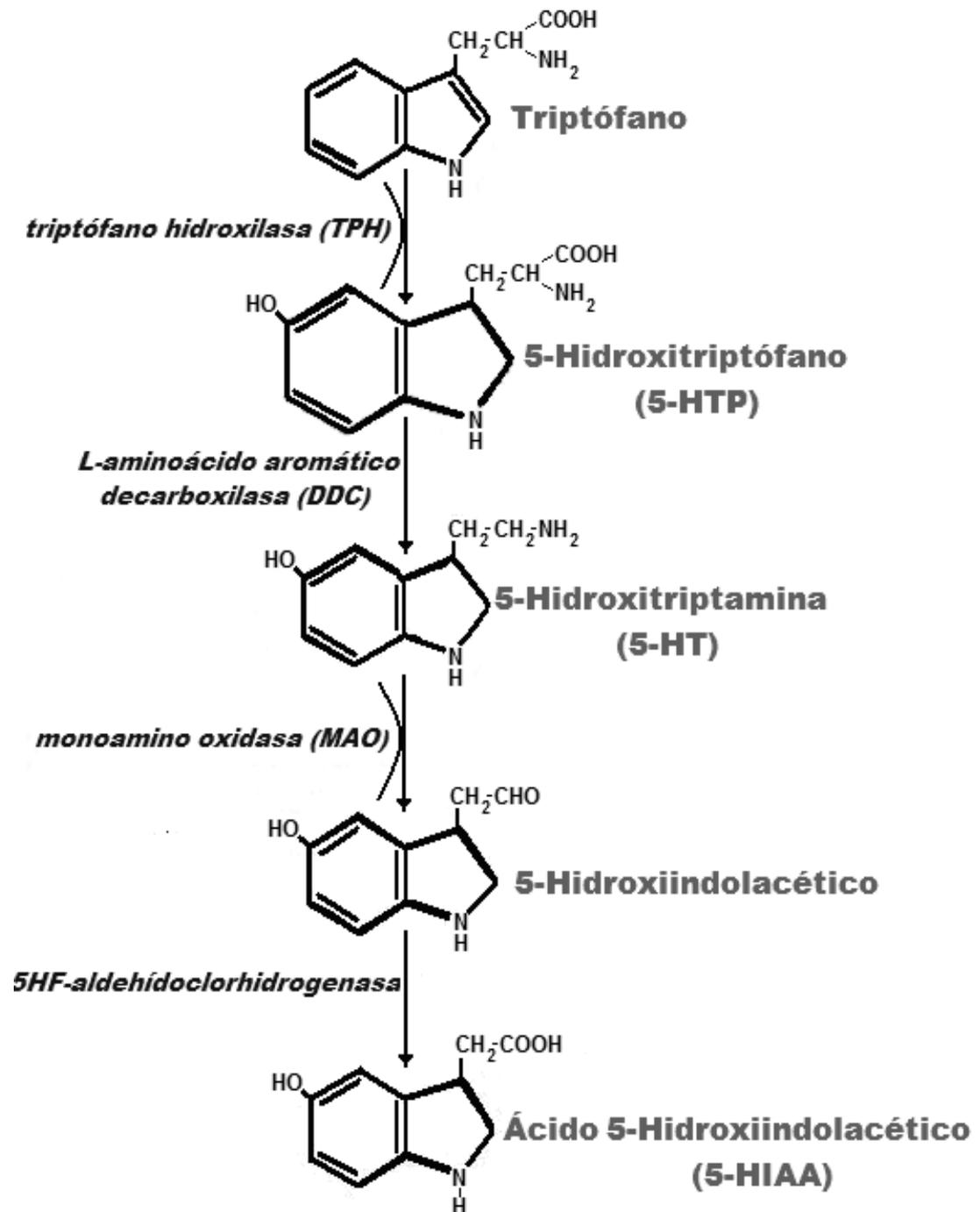


Figura 5.- Síntesis de la serotonina (modificada de Green, 2006).

Cuando se analizaron algunas regiones del cerebro y tejidos periféricos se detectaron dos picos de actividad con punto isoeléctrico diferente (Koe, 1971; Nakata y Fujisawa, 1982). Cuando se sintetizaron los anticuerpos contra la TPH en una línea celular de ratón (P815), se identificó la enzima en el intestino, pero no en el cerebro (Hasegawa y col., 1987). Además, existe polimorfismo genético en ambos tipos, lo que llevó a los autores a mostrar la existencia de isoformas de la TPH.

Con base en lo antes mencionado se sugiere la existencia de dos sistemas serotoninérgicos, el del encéfalo y el que se encuentra en los tejidos periféricos, los cuales son regulados diferencial e independientemente (Walther y Bader 2003). La TPH también se encuentra en neuronas entéricas, en embriones preimplantados, mastocitos y en células enterocromafines del tracto gastrointestinal. Este último tipo celular es la fuente de serotonina de la sangre (Walther, y Bader, 2003).

1.5.1 Metabolismo de la Serotonina

La serotonina liberada y que no se une a su receptor es recapturada por la terminal serotoninérgica, y por acción de la enzima monoamino oxidasa se transforma en el metabolito inactivo, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Tanis y col., 2007). Grahame-Smith (1971), mostró que la función de la neurona serotoninérgica es regulada en parte por el metabolismo intracelular de la serotonina. Blaschko (1970), identificó dos isoformas de la enzima MAO (MAOA y MAOB). La tipo A participa en el metabolismo de la serotonina y la B es esencial para el metabolismo de las catecolaminas (figura 6) (Green, 2006). Se han identificado siete subtipos de receptores a serotonina, 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇ (Jahn y Deis, 1988; Barnes y Sharp, 1999), que se localizan en la membrana celular de las células nerviosas y de otros tipos celulares (Boldrinia y col., 2008; Turner y col., 2007) (Apendice A).

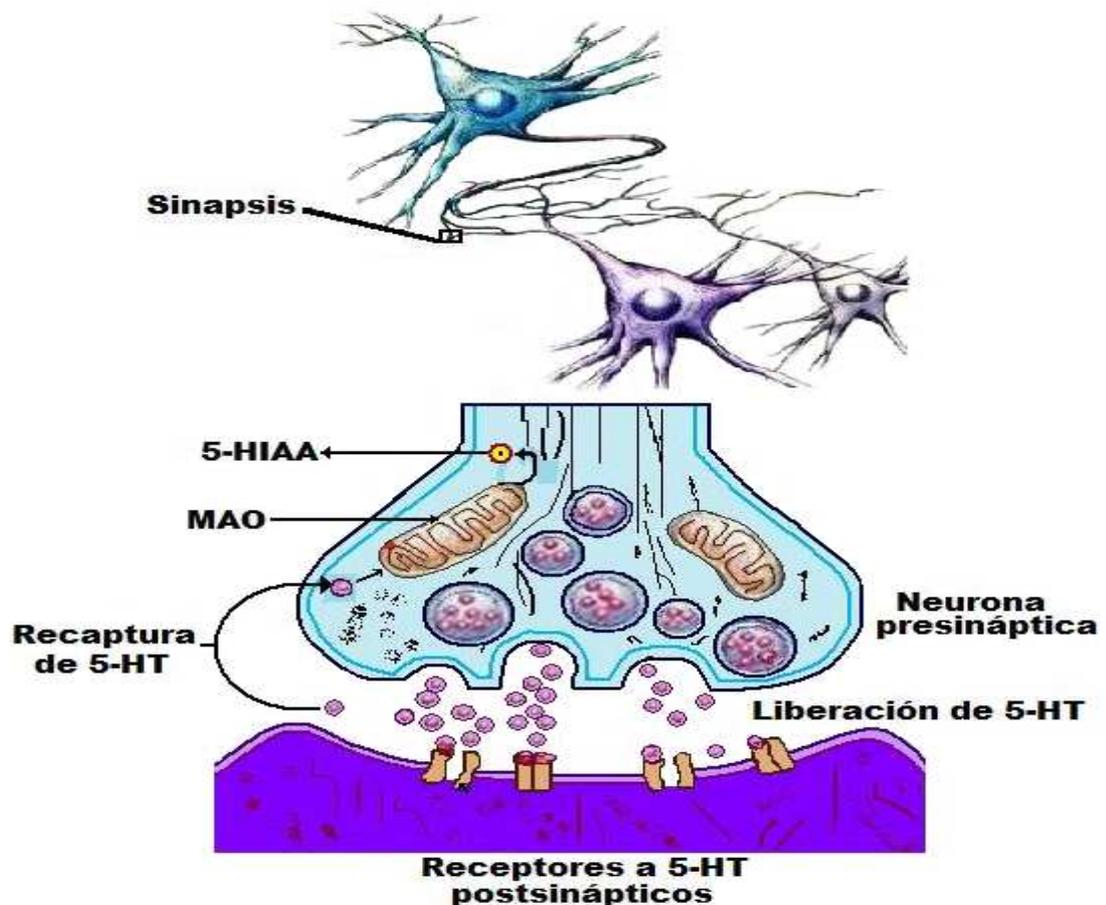


Figura 6.- Sinapsis serotoninérgica, serotonina (5-HT); ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA); enzima monoamina oxidasa (MAO), (modificada de Baumgarten y Göthert, 2000).

1.5.2 Funciones de la Serotonina

En el sistema nervioso central a la serotonina se le ha asociado en la regulación de la temperatura corporal, el estado de ánimo, sueño, apetito, comportamiento sexual, la regulación de la secreción de hormonas por la hipófisis y del funcionamiento de glándulas endocrinas como el ovario y el testículo (Aragón y col., 2005; Homberg y col., 2007; Morán y col., 2001; Monroy y col., 2003; Tanis y col., 2007). También se le asocia con trastornos de la alimentación, depresión y ansiedad. Actúa en tejidos periféricos, en donde regula el tono vascular, la movilidad intestinal y la respuesta inmune (Jackson y col., 1985; Walther y col., 2003).

1.6 Ovario

El aparato reproductor de la hembra está constituido por dos ovarios, dos oviductos, el útero, la vagina y los genitales externos. De estos, componentes el ovario se considera el órgano primario del sistema reproductor de la hembra, debido a que mediante sus secreciones hormonales mantiene la estructura y funcionamiento del resto de los órganos del sistema reproductor (Will y col., 2004).

El ovario es un órgano par, de color rojo grisáceo, unido a ambos lados del útero por el ligamento ancho del útero. Las funciones de este órgano son la producción de óvulos y secreción de hormonas esteroides sexuales, estrógenos, progesterona y testosterona; hormonas proteicas, inhibina y activina, así como factores de crecimiento (Abbott y col., 2008; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Guraya, 2000). Está rodeado por una capa de peritoneo que se denomina bursa ovárica, la cual está compuesta por tres capas, la interna un epitelio discontinuo que limita con el ovario, la intermedia formada por tejido conectivo y la externa conformada de un epitelio continuo que limita con la cavidad peritoneal. La bursa impide que los ovocitos salgan a la cavidad abdominal (Vanderhyden y col., 1986).

En el ovario se describen dos regiones: 1) la médula o porción central del ovario, la que contiene tejido conectivo laxo, vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios noradrenérgicos y peptidérgicos que penetran y salen por el hilio del ovario, 2) la corteza o región periférica que rodea a la médula y contiene los folículos ováricos incluidos en tejido conectivo. En la corteza se encuentra el estroma, que rodea los folículos y fibras aisladas de músculo liso y estriado, así como el parenquima. El límite entre la médula y la corteza no está bien definido (Boya, 1999; Geneser, 2000; Guraya, 2000) (figura 7). El folículo es la unidad anatómica y funcional del ovario, debido a que a partir de esta estructura derivan otros dos componentes que son el cuerpo lúteo y la glándula intersticial (Figura 7) (Domínguez, 1991).

En el ovario se identifican folículos en diferentes etapas de desarrollo. El folículo primordial, que se forma durante la etapa fetal, consiste de un ovocito en el que se ha suspendido la primera división meiótica en la etapa de diploteno de la profase, y es rodeado de 6 ó 7 células somáticas aplanadas. Este tipo de folículos forman grupos, que se localizan en la corteza del ovario (Domínguez, 1991) y no proliferan después del nacimiento y son la fuente de gametos de la hembra durante su vida reproductiva (Hirshfield, 1991).

Del grupo de folículos primordiales, algunos inician su desarrollo y se transforman en el folículo primario que se caracteriza porque las células que rodean al ovocito adquieren forma cúbica y se diferencian a células de la granulosa (Domínguez, 1991). Estas células se multiplican por mitosis y constituyen varias capas de células de la granulosa alrededor del ovocito y se forma el folículo en crecimiento. En este tipo de folículo las células de la granulosa proliferan y dan lugar a varias capas de células que rodean al ovocito. Conforme los folículos aumentan de tamaño aparecen cavidades que se llenan de líquido; este tipo de folículo recibe el nombre de folículo secundario o antral (Berkholtz y col., 2006). Las cavidades se fusionan y se forma el antro folicular, que contiene agua, estrógenos, noradrenalina y hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), entre otros componentes (Hirshfield, 1991). Rodeando a las células de la granulosa se encuentra la membrana basal y alrededor de esta se ubica la teca interna y externa que se diferencia a partir del tejido conjuntivo circundante (Berkholtz y col., 2006). Las células de granulosa expresan receptores a la hormona estimulante del folículo (FSH), la cual es fundamental para continuar con el desarrollo del folículo (Sauvat, 2008).

El folículo maduro o folículo de Graaf, se caracteriza porque en uno de los lados de la cavidad antral se sitúa el ovocito rodeado por células de la granulosa, la corona radiata (Berkholtz y col., 2006). El ovocito de este folículo, se encuentra suspendido en la metafase II de la meiosis y solamente finalizará el proceso meiótico si es fecundado (Espinosa y Sánchez, 2005).

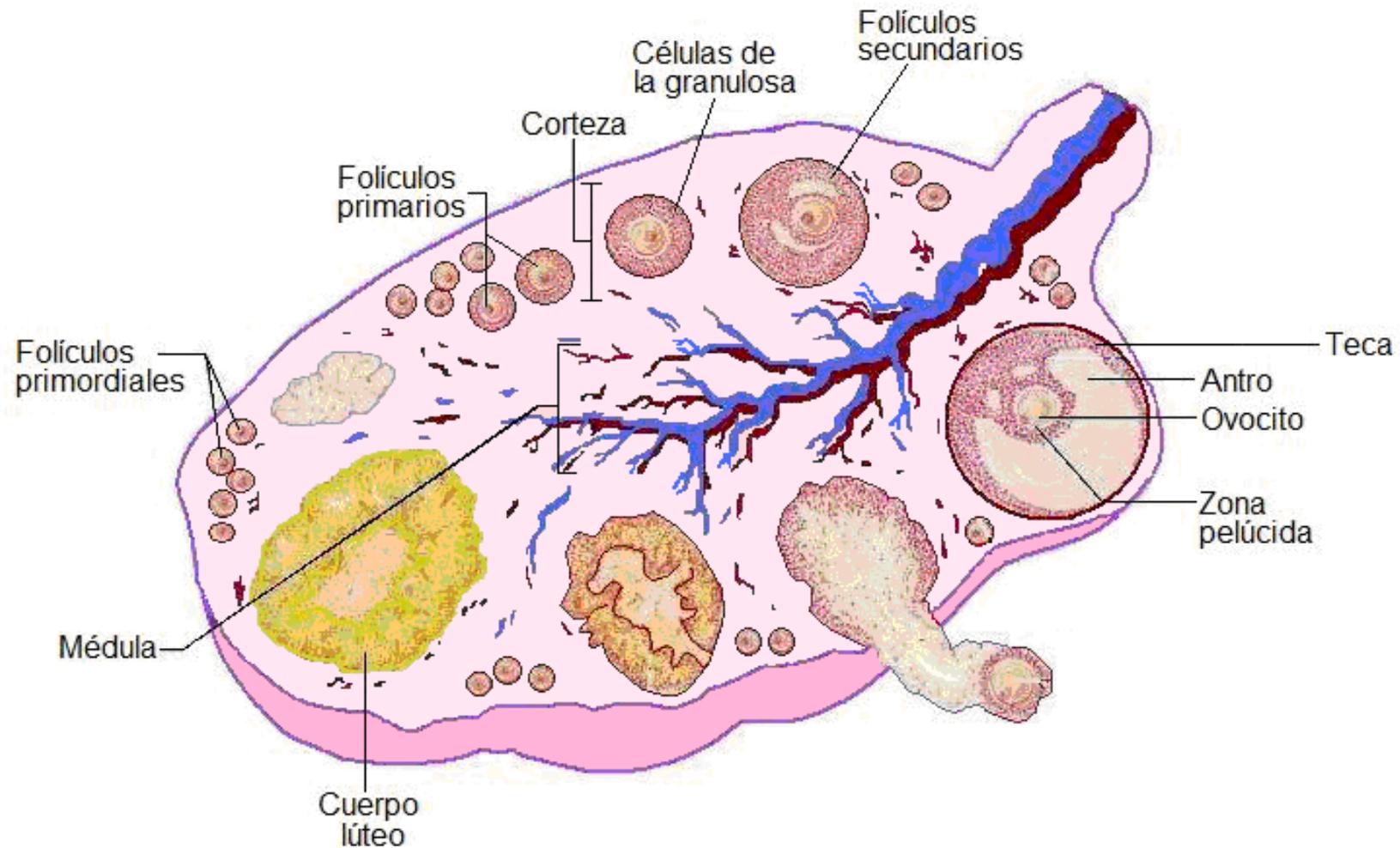


Figura 7.- Esquema de un ovario en el que se muestran las regiones de este órgano, así como los folículos en las diferentes etapas de desarrollo (modificado de Tulsiani, 2002).

La hormona luteinizante (LH), actúa en el folículo de Graaf y estimula la producción de enzimas proteolíticas, que disgregan la pared del folículo en la región distal al ovocito, lo que propicia que entre agua y plasma al antro folicular. Posteriormente el ovocito es expulsado del folículo y es transportado al oviducto (Berkholtz y col., 2006; Lucidi y col., 2003). Después de la liberación del ovocito (ovulación), los restos de células de la granulosa y de las tecas forma el cuerpo lúteo. En la etapa inicial de formación del cuerpo lúteo se distinguen dos tipos celulares, unas externas y pequeñas y las del interior, que constituyen la mayor parte del cuerpo lúteo. Esta estructura produce progesterona (Battista y col., 1987).

El desarrollo del folículo es regulado por la FSH, LH, los estrógenos y factores intraováricos. La FSH estimula la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa y promueve su desarrollo a folículos preovulatorios.

Durante el desarrollo y la diferenciación de los folículos, se secretan los estrógenos que actúan en forma sinérgica con las gonadotropinas promoviendo el crecimiento ovárico y la formación de los receptores a la LH y FSH (Domínguez, 1991). Además también regulan la secreción de las gonadotropinas por un mecanismo de retroalimentación negativo y positivo al actuar en el hipotálamo o la hipófisis (Kotsuji y col., 1990; Chabrolle y col., 2008).

Conforme el folículo crece adquiere mayor capacidad para sintetizar hormonas esteroideas, progesterona, testosterona y estradiol. La esteroidogénesis folicular depende de ambas gonadotropinas entre otros factores (Jamnongjit y Hammes, 2005). La LH incrementa la transformación del colesterol a testosterona en las células de la teca (Chern y col., 2000). Esta difunde a través de la lámina basal y es convertido en estradiol por las células de la granulosa por la acción del complejo enzimático de la aromatasa, que es activado por la FSH (Yada y col., 1999).

Las funciones de la gónada son reguladas entre otros factores por las gonadotropinas [LH y FSH], cuya secreción es modulada por el hipotálamo vía la GnRH y por las hormonas secretadas por el propio ovario y por los neurotransmisores (serotonina, catecolaminas y neuropéptidos) que participan en la modulación de la secreción de la GnRH y las gonadotropinas (Brown, 1994).

1.7 Esteroidogénesis

La síntesis de hormonas esteroides en el ovario se lleva a cabo a partir del colesterol. Tanto el colesterol como sus derivados esteroides, tienen un esqueleto básico compuesto por 4 anillos internos y 27 carbonos. El colesterol se transporta en la sangre unido a moléculas grandes llamadas lipoproteínas. En circulación existen cinco clases de lipoproteínas: quilomicrones (QM), de muy baja densidad (VLDL), de densidad intermedia (IDL), de baja densidad (LDL) y de alta densidad (HDL), la que preferentemente transporta el colesterol a las células, es la LDL (Espinosa y Sánchez, 2005).

El colesterol también se sintetiza a partir del acetyl coenzima A y se almacena en las células de la teca en forma de ésteres de colesterol. La LH al unirse a sus receptores de membrana en las células de la teca, estimula la formación del adenosin monofosfato cíclico (AMPC), segundo mensajero, que activa una cascada de señalización intracelular y a la enzima esterasa, que actúa en los ésteres de colesterol y permite que el colesterol sea transportado a la mitocondria (Yazawa y col., 2002). El colesterol se transporta a las mitocondrias por el citoesqueleto celular y por dos proteínas transportadoras, la SCP-2 y la FABP (proteína de unión de los ácidos grasos) (Sanne y Krueger, 1995). En este organelo celular se convierte en pregnenolona y ácido caproico mediante la hidroxilación en los carbonos 20 y 22 y el desdoblamiento de la cadena lateral por la 20,22 desmolasa. Esta es una etapa limitante de la esteroidogénesis y es estimulada por la LH (Thiboutot y col., 2003).

A partir de la pregnenolona, la síntesis de esteroides puede seguir dos vías: 1) la vía delta 4 ($\Delta 4$) o de las cetonas (que se lleva a cabo principalmente en el ovario) y la vía delta 5 ($\Delta 5$) (principalmente en la suprarrenal) (Sanne y Krueger, 1995). En la $\Delta 4$, la pregnenolona se convierte en progesterona mediante dos fases enzimáticas reguladas por la 3β -ol-deshidrogenasa y $\Delta 4$ -5-isomerasa y se forma la progesterona. Posteriormente la hidroxilación de la progesterona en el carbono 17 da lugar a la 17-hidroxiprogesterona. La acción de la desmolasa convierte la 17-hidroxiprogesterona en androstendiona (19C ó andrógeno). La acción de la 17β -ol-deshidrogenasa sobre la androstendiona da lugar a la testosterona (Haseltine y Findlay, 1991).

En la vía $\Delta 5$, la pregnenolona por hidroxilación en el carbono 17 se convierte en 17-hidroxi pregnenolona. Mediante una desmolasa, se convierte en dehidroepiandrosterona (DHA). La 3β -ol-deshidrogenasa y la $\Delta 4$ -5 isomerasa actúan sobre la DHA y forman androstendiona a partir de la cual se forma la testosterona.

Los andrógenos se difunden a las células de la granulosa en donde son aromatizados a estrógenos. La aromatización del anillo A de la androstendiona da lugar a la estrona y la aromatización de la testosterona da lugar al 17β -estradiol (figura 8) (Sanne y Krueger, 1995). Este proceso es estimulado por la FSH, mediante la formación del AMPc, que actúa como segundo mensajero en la célula de la granulosa y desencadena la secuencia de eventos que culminan con la activación de la enzima aromatasa que convierte los andrógenos a estrógenos. Estas hormonas esteroides actúan en el propio folículo y también difunden a la circulación general para actuar en órganos blanco situados a distancia (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Erickson y Shimasaki, 2001).

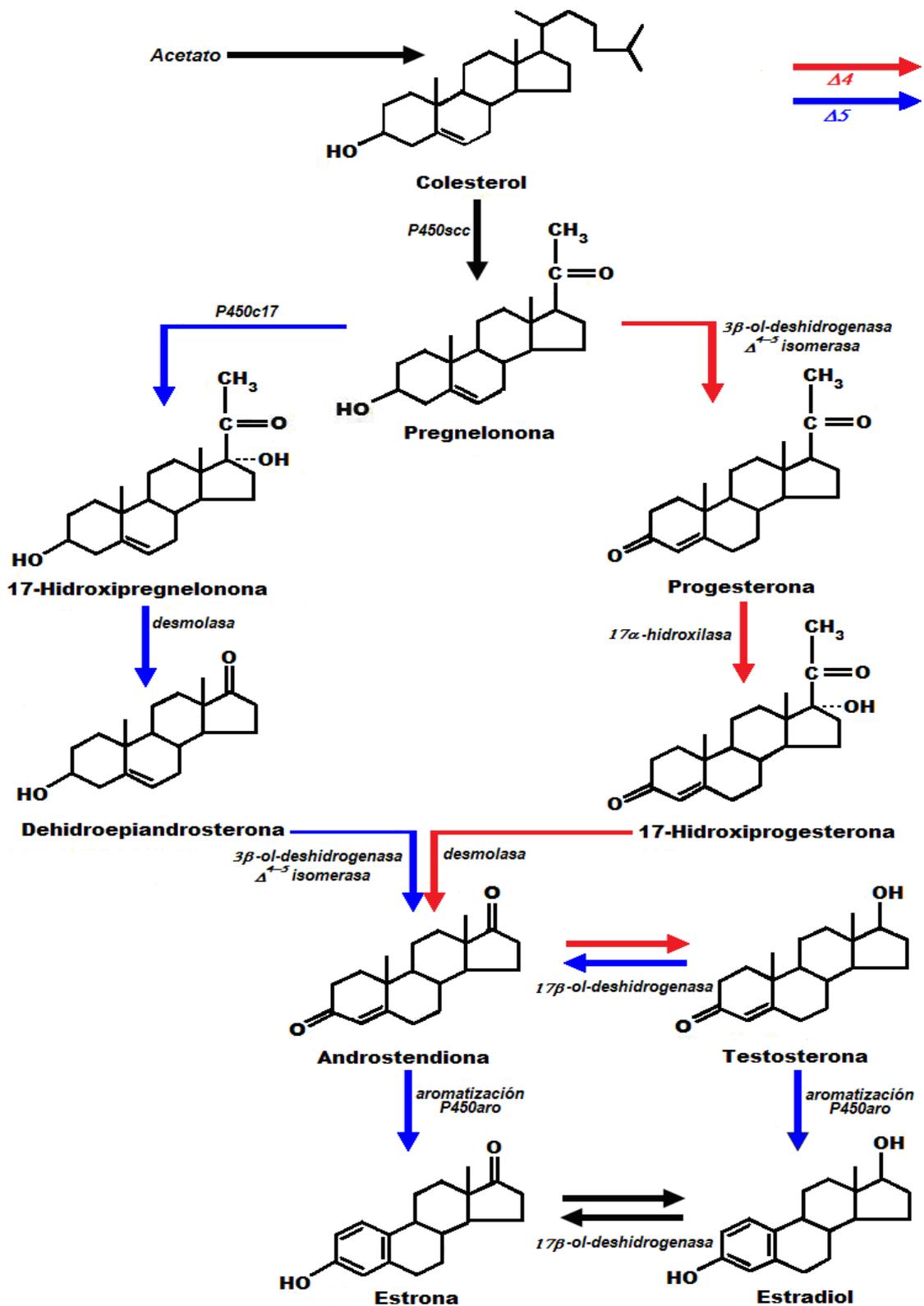


Figura 8.- Proceso de esteroidogénesis (modificado de Espinosa y Sánchez, 2005).

El ovario produce fundamentalmente estradiol y en menor proporción estrona; menos activa. También en la grasa se produce estrona por acción de la aromatasas. Los estrógenos circulantes proceden no sólo del ovario, sino también de la conversión periférica. A la llegada al hígado, el estradiol se transforma en estrona y a su vez en 16α -hidroxiestrona y por último una 17β -hidroxilación da lugar al estriol. También se metaboliza a 2-hidroxi-estrona y 2-metoxiestrona (llamados catecolestrógenos por su semejanza estructural con las catecolaminas) (Espinosa y Sánchez, 2005).

La secreción de la GnRH y de las gonadotropinas es regulada por diferentes sistemas de neurotransmisión entre los que se encuentra la serotonina. 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 (Jennes y col., 1982), lo que ha permitido sugerir que este neurotransmisor participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis y como consecuencia en las funciones del ovario como la esteroidogénesis. Sin embargo, también es posible que esta amina module la esteroidogénesis en el ovario, posiblemente al actuar directamente en el ovario.

1.8 Serotonina y Funciones del Ovario

La serotonina participa en la modulación de eventos reproductivos, al actuar directamente en los órganos del aparato reproductor (Amenta y col., 1992; Sirotkin y Schaeffer, 1997). Cuando se cuantificó la concentración de serotonina por cromatografía de líquidos en los diferentes componentes del aparato reproductor de la rata, se observó una alta concentración de la amina en el oviducto, seguido en orden descendente por el cervix, el ovario y el útero. Por estudios de inmunohistoquímica se identificó a la serotonina en el citoplasma de los mastocitos; células que se encuentran en el tejido conectivo que rodea al oviducto, en el útero y el ovario (Amenta y col., 1992; Veselá y col., 2003).

La serotonina que se localiza en el ovario se origina de los mastocitos y de las plaquetas (Sirotkin y Schaeffer, 1997; Veselá y col., 2003). Según Amireault y Dubé (2005 a y b) la amina también se sintetiza y metaboliza directamente en el ovario. Esta idea se apoya en el hecho de que se identificó la TPH, enzima limitante en la síntesis de serotonina en las células de la granulosa que rodean al ovocito del ratón. En el ovario de la rata se encuentra la monoamino oxidasa A y B, enzimas que participan en el catabolismo de la serotonina y de las catecolaminas respectivamente. La MAOA se encuentra en mayor proporción en el cuerpo lúteo y la B en los vasos sanguíneos que irrigan al órgano (Yoshimoto y col., 1986).

Inicialmente se propuso que la fuente de serotonina de los órganos del aparato reproductor eran las fibras nerviosas que los inervan. En la rata adulta, por inmunohistoquímica se demostró inmunoreactividad a la amina en la región perivascular del cervix, los cuernos uterinos y en el oviducto (Amenta y col., 1992). Sin embargo, no se han identificado fibras serotoninérgicas en los ovarios (Sirotkin y Schaeffer, 1997). Por estudios farmacológicos y de inmunohistoquímica también se han identificado los receptores a serotonina en los ovarios del criceto, células de la granulosa de humanos, en el cumulus oophorus y en el ovocito de ratón (Dube y col., 2007; Sirotkin y Schaeffer, 1997).

Existen evidencias de que la rata adulta y prepúber, la serotonina posiblemente participa en la regulación de las funciones del ovario, tanto en el proceso de esteroidogénesis, el crecimiento y la diferenciación del folículo y en el proceso de ovulación (Tanaka y col., 1993; Gallegos, 2007; Schmidt y col., 1987). Entre las estrategias experimentales que se han empleado para analizar la participación de esta amina en la esteroidogénesis se encuentran 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 (Tanaka y col., 1993; Schmidt y col., 1987).

Cuando a ratas adulta se les administró ketanserina (antagonista selectivo de los receptores 5-HT₂), se observó que la concentración sérica de estradiol disminuyó inmediatamente después de la administración del fármaco. Así mismo, cuando los folículos preovulatorios de rata se mantienen en cultivo y se adiciona ketanserina al medio, se inhibe la producción de progesterona, testosterona y estradiol. Un efecto opuesto se observa cuando se mantienen *in vitro* folículos de criceto en proestro y se adiciona serotonina al medio lo que estimula la producción de estradiol (Terranova y col., 1990). Estas evidencias son interpretados como una prueba de que la serotonina regula la esteroidogénesis de forma estimulante.

Cuando se mantiene *in vitro* el cuerpo lúteo de vaca, la administración de serotonina estimula la producción de progesterona (Battista y Condon 1986). Sin embargo, cuando este mismo tratamiento se aplica a células de la granulosa de cerda *in vitro* se observó un efecto dual; con dosis bajas de la amina no se modificó la secreción de progesterona, mientras que con dosis mayores se estimuló la producción del esteroide (Sirotkin, 1995; Bodis y col., 1993).

En la rata hembra prepúber, de 30 días de edad, la administración de sulfato de serotonina por vía sistémica o directamente en la bursa del ovario disminuye la secreción de progesterona y estradiol a las 24 ó 48 horas postratamiento (Gallegos, 2007; Romero, 2009), por lo que se sugiere que la serotonina participa de forma inhibitoria en la modulación de la esteroidogénesis.

Las evidencias que existen sobre la participación de la serotonina en la modulación de la esteroidogénesis son contradictorias. Es posible que estas diferencias sean el resultado de que la amina participa de manera diferencial en este proceso en el animal adulto y en el prepúber.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los antecedentes antes mencionados permiten plantear que la serotonina participa en la modulación de la esteroidogénesis por el ovario, debido a que regula la secreción de la GnRH por el hipotálamo y de la FSH y LH por la hipófisis. Estas gonadotropinas al actuar en el ovario estimulan la secreción de progesterona, testosterona y estradiol. Otra posibilidad es que la amina actué directamente en el ovario modulando la secreción de esteroides. En relación a esto, se ha mostrado que en el ovario existe una isoforma de la enzima triptofano hidroxilasa, limitante en la síntesis de serotonina, lo lleva a pensar que esta amina se sintetiza también en el ovario

Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de 5-hidroxitriptofano por vía sistémica o en la bursa del ovario a ratas hembras de 30 días de edad sobre la concentración de serotonina y sus metabolito en el hipotálamo, hipófisis y ovario, así como en la concentración de gonadotropinas (FSH y LH) y esteroides sexuales (progesterona, testosterona y estradiol) en el suero.

3. HIPÓTESIS

La serotonina participa de manera estimulante en la modulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas, esenciales en la regulación de la esteroidogénesis por el ovario, por ello la administración del precursor, 5-hidroxitriptofano se traducirá en el incremento en la síntesis de 5-HT en el hipotálamo, hipófisis y en el ovario, lo que se acompañará del incremento en la concentración de gonadotropinas (LH y FSH) y de hormonas esteroides sexuales (progesterona, testosterona y estradiol).

4. OBJETIVO GENERAL

Estudiar los efectos de la estimulación de la síntesis de serotonina en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario sobre la secreción de progesterona, testosterona y estradiol usando a la rata hembra prepúber como modelo de estudio.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Analizar los efectos de la administración del 5-hidroxitriptofano por vía sistémica en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo, la hipófisis y el ovario.
2. Analizar los efectos de la administración del 5-hidroxitriptofano por vía sistémica en la concentración de gonadotropinas en el suero.
3. Analizar los efectos de la administración del 5-hidroxitriptofano por vía sistémica en la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en el suero.
4. Analizar los efectos de la administración del 5-hidroxitriptofano en la bursa del ovario en la concentración de serotonina y de su respectivo metabolito (5-HIAA) en este órgano.
5. Analizar los efectos de la administración del 5- hidroxitriptofano en la bursa ovárica en la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en el suero.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra de 30 días de edad, de la cepa CII-ZV (bioterio FES Zaragoza), mantenidas en condiciones controladas de iluminación (5:00 a 19:00 luz y 19:00 a 5:00 oscuridad), con libre acceso a la madre hasta el momento del destete (21-23 días) y posteriormente al agua y alimento *ad libitum*.

5.1 Análisis de los Efectos de la Administración del 5-hidroxitriptofano por Vía Sistémica.

Entre las 10:00 y 11:00 horas a ratas hembra de 30 días de edad se les administró por vía intraperitoneal (i.p.), 100 mg/kg de peso corporal de 5-hidroxitriptofano (Sigma Chemical St. Louis MO, EV.) disuelto en solución salina al 0.9%. Otro grupo de animales se les administró solución salina (0.9%) por vía intraperitoneal (i.p.) y como grupo de comparación se utilizaron animales sin tratamiento. Los animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron a los 30, 60, 90 ó 120 minutos después de la administración del fármaco. Los tiempos de sacrificio de los animales se eligieron con base en lo reportado por Moguilevsky y colaboradores (1985), quienes mostraron que cuando se administra el 5- hidroxitriptofano por vía intraperitoneal el incremento en la síntesis de serotonina en el hipotálamo se observa a partir del día 30 y su mayor efecto se encuentra a los 60 minutos, para posteriormente disminuir a los 90 y 120 minutos.

5.2 Análisis de los efectos de la Administración de 5-Hidroxitriptofano en la Bursa del Ovario

Entre las 10:00 y 11:00 horas a ratas hembra de 30 días de edad se les administró directamente en la bursa del ovario el 5-hidroxitriptofano en una dosis de 0.0015 mg/40 µl/ovario. Como grupo de comparación se utilizaron animales a los que se les inyectó exclusivamente solución salina en un volumen

de 40 μ l/ovario. Grupos de animales se sacrificaron a los 60 ó 120 minutos después del tratamiento.

5.2.1 Procedimiento de Inyección en Bursa del Ovario

Los animales se anestesiaron con éter, se colocaron en la tabla de operación, se realizó una incisión en piel y músculo en la parte ventral, se exteriorizaron los ovarios para la inyección del fármaco o de la solución salina. Después de realizar la inyección en la bursa de los ovarios, la jeringa se mantuvo por 1 min en esa posición para permitir que difundiera el fármaco, posteriormente se retiró la jeringa, se regresaron los ovarios a la cavidad abdominal y se suturó piel y músculo (figura 9) (Domínguez y col., 1998).

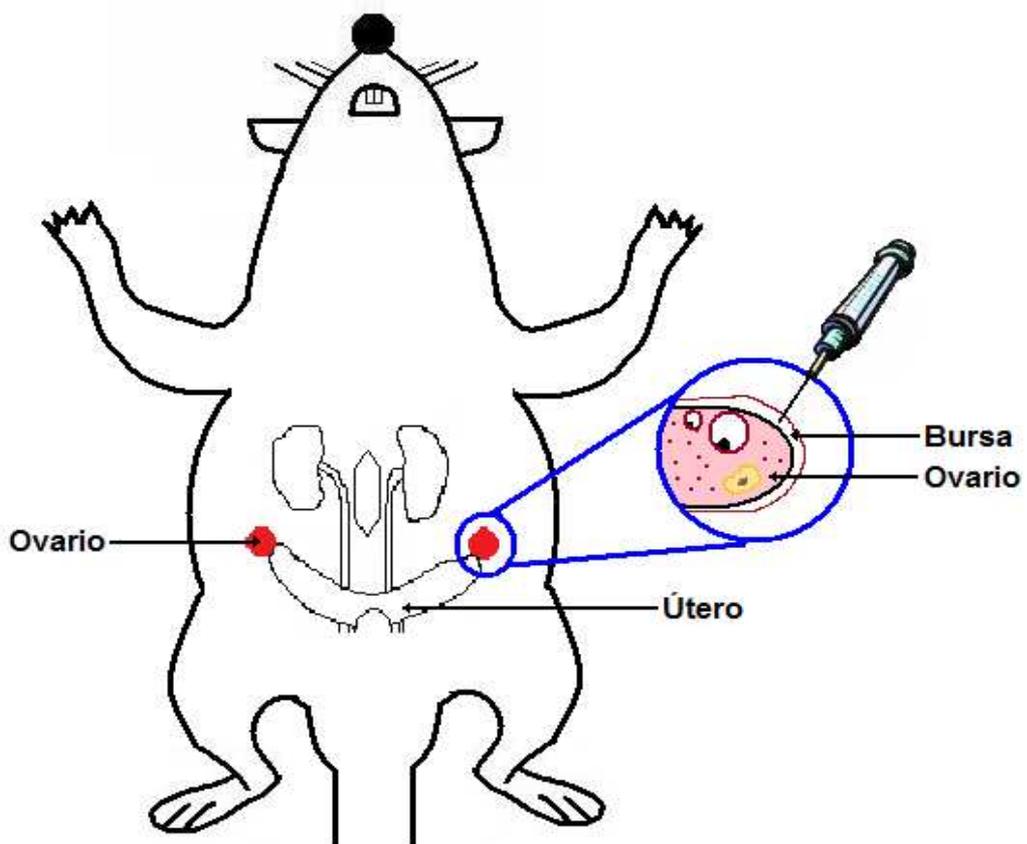


Figura 9.- Esquema en el que se muestra la localización de los ovarios y la forma de la administración del fármaco o solución salina en la bursa del ovario.

5.3 Procedimiento de Autopsia

Los animales se sacrificaron por decapitación, se colectó la sangre del tronco, se dejó reposar 20 minutos y se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se colectó el suero y se almacenó a -20° C hasta la posterior cuantificación de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y 17β -estradiol) y de gonadotropinas (FSH y LH).

5.3.1 Cuantificación de Hormonas

La cuantificación de las hormonas esteroides en el suero se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis, para lo cual se utilizó un kit comercial (Coat-A-Count): La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/ml de suero y la de estradiol en pg/ml de suero.

La cuantificación de LH y FSH se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo. El National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, M. D, EV) donó los anticuerpos para la cuantificación y fueron: NIAMDD-Rat-LHRP3 y NIAMDD-Rat-FSH. La concentración de ambas gonadotropinas se expresó en ng/ml de suero.

5.4 Cuantificación de Neurotransmisores

En el momento de la autopsia se extrajo el cerebro y se colocó en solución fisiológica fría (0° C) para eliminar la sangre. Se realizó la disección del hipotálamo anterior y medio siguiendo las coordenadas propuestas en el atlas de cerebro de Paxinos y Watson (1982). Se disecó la hipófisis y ambos ovarios. Las muestras se almacenaron a -70° C hasta la posterior cuantificación de serotonina y 5-HIAA, por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) siguiendo la metodología usada por Ayala y col. (1998) (Apéndice A). La concentración de los neurotransmisores y sus metabolitos se expresó en ng/mg de tejido.

Con las concentraciones de los neurotransmisores y de sus metabolitos en el hipotálamo de los diferentes grupos experimentales, se realizó el cálculo de la relación metabolito/neurotransmisor, indicador de la actividad de un sistema de neurotransmisión (Kerdelhué y col., 1989).

5.5 Análisis Estadístico

Los resultados de la concentración de 5-HT y 5-HIAA, así como la concentración de FSH, LH, progesterona, testosterona y estradiol en el suero se analizaron por una ANOVA seguida de Tukey. Cuando se compararon los resultados de dos grupos se realizó el análisis por la prueba "t" de Student. Se consideraron como significativas las diferencias entre los grupos cuando la probabilidad fue igual o menor al 0.05.

6. RESULTADOS

6.1 Efecto de la Administración del 5-Hidroxitriptofano por Vía Sistémica

6.1.1 Concentración de 5-HT y 5-HIAA en Hipotálamo e Hipófisis

En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales que se inyectaron con solución salina (Vh) por vía sistémica no se presentaron cambios en ninguno de los parámetros evaluados. Por ello se conjuntaron los dos grupos y se formó un grupo testigo para analizar los efectos producidos por la administración de 5-hidroxitriptofano.

En comparación con el grupo testigo, en los animales que se inyectaron con 5-hidroxitriptofano la concentración de 5-HT fue mayor en el hipotálamo anterior de los animales sacrificados a los 60 ó 90 minutos, mientras que a los 30 y 120 minutos no se observaron cambios significativos. La concentración del 5-HIAA fue mayor independientemente del tiempo transcurrido entre la inyección y el sacrificio (Figura 10). La relación 5-HIAA/5-HT fue mayor que en el testigo en los animales sacrificados a los 30 y 90 minutos postratamiento (figura 10).

En el hipotálamo medio de los animales inyectados con 5-HTP la concentración de 5-HT fue mayor a los 60 y 90 minutos y el 5-HIAA a los 30, 60 y 120 minutos postratamiento en comparación con la del grupo testigo. La relación 5-HIAA/5-HT fue mayor en los animales sacrificados a los 30 minutos (figura 11).

La concentración de 5-HT y del 5-HIAA en la hipófisis de todos los animales que se inyectaron con el 5-hidroxitriptofano fue mayor en comparación a los animales testigo (figura 12).

6.1.2 Concentración de Gonadotropinas

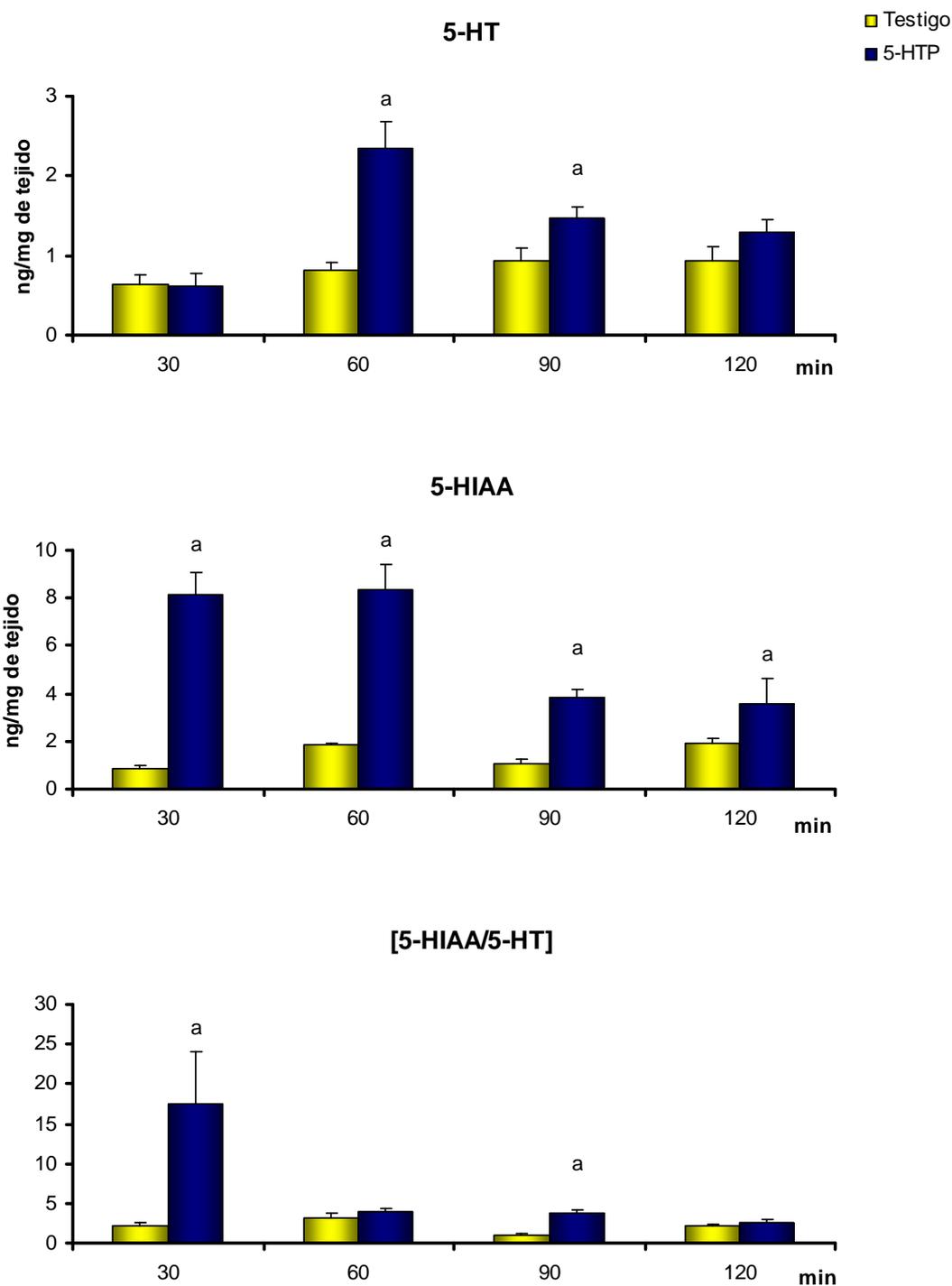
En los animales tratados con el 5-hidroxitriptofano, la concentración de LH fue menor que en el grupo testigo (figura 13). La concentración de FSH en el suero de los animales fue mayor en los animales sacrificados a los 120 minutos (figura 13).

6.1.3 Concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el Ovario

La concentración de 5-HT y 5-HIAA en el ovario de los animales inyectados con 5-hidroxitriptofano fue mayor en todos los periodos estudiados, que en el grupo testigo (figura 14).

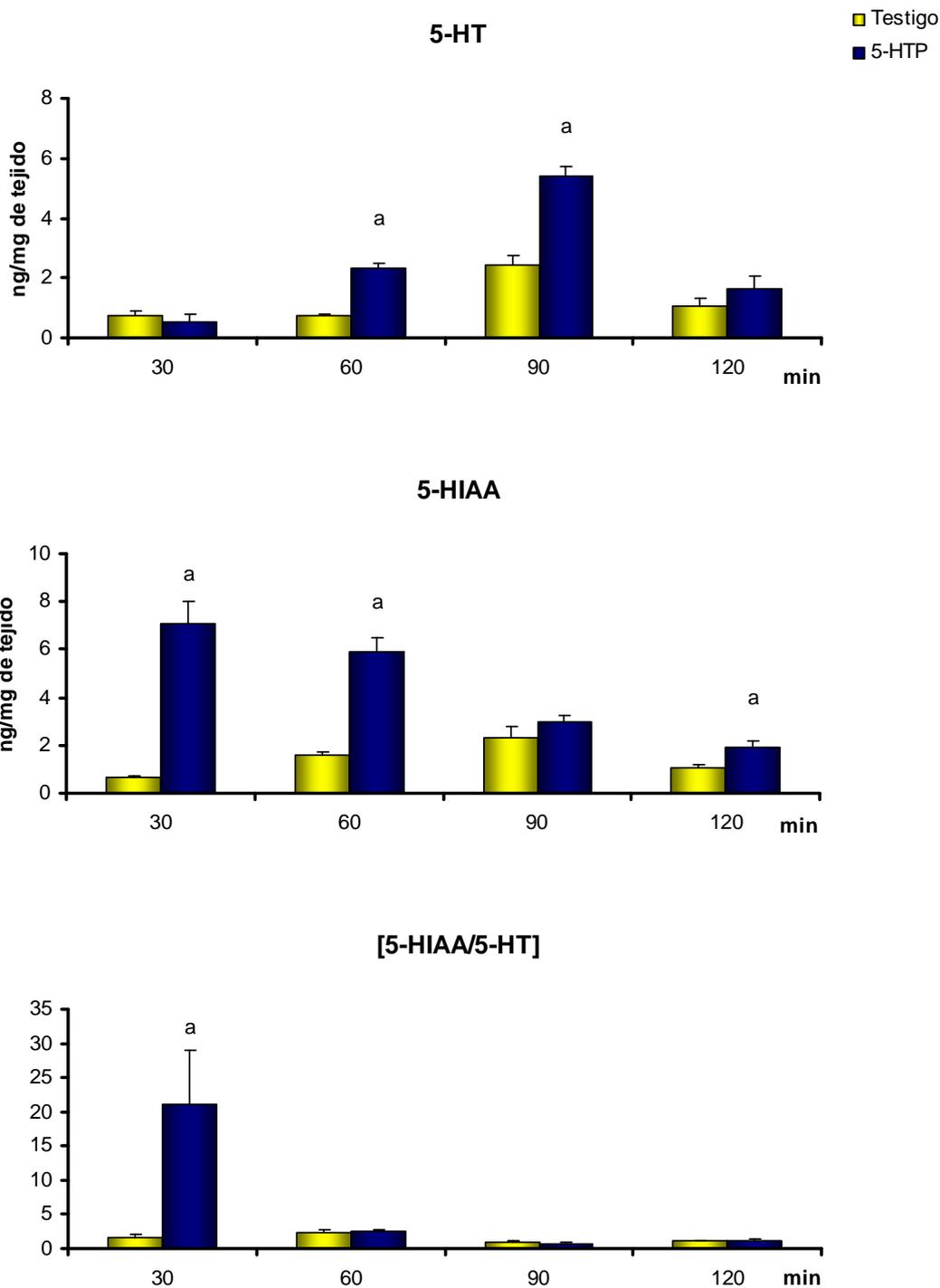
6.1.4 Concentración de Hormonas Esteroides

En relación con el grupo testigo, en los animales que inyectados con 5-hidroxitriptofano, la concentración de progesterona en suero fue mayor a los 30 minutos postratamiento y la de testosterona a los 30 y 60 minutos, mientras que en los sacrificados a los 90 ó 120 minutos se observó un comportamiento inverso. La concentración de estradiol fue mayor a los 30 y 90 minutos y menor a los 120 minutos (figura 15).



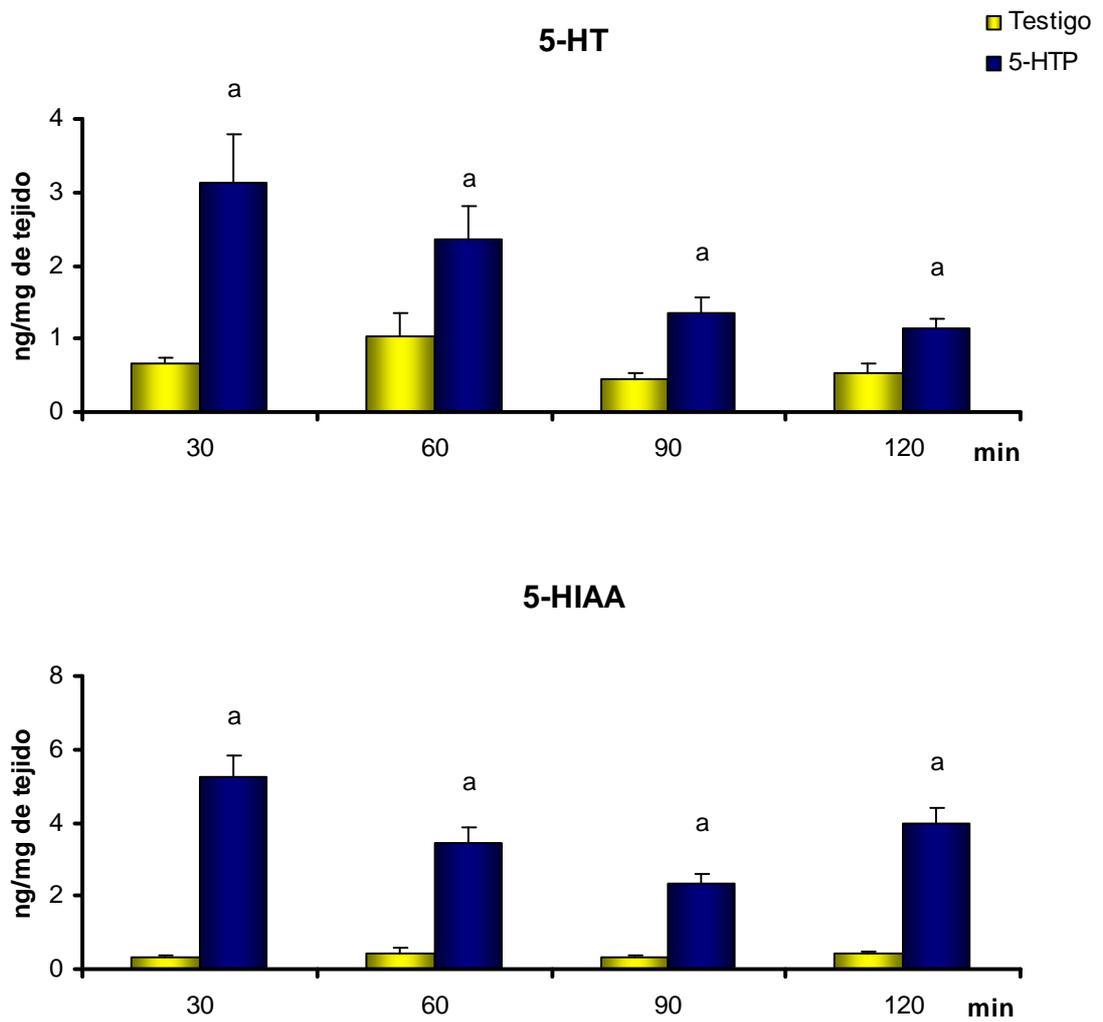
a, $p < 0.05$ vs. grupo TA+Vh (prueba de t-Student).

Figura 10.- Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA/5-HT] en el hipotálamo anterior de ratas testigo o tratadas con 100 mg/kg de p.c. de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y sacrificadas a diferentes tiempos.



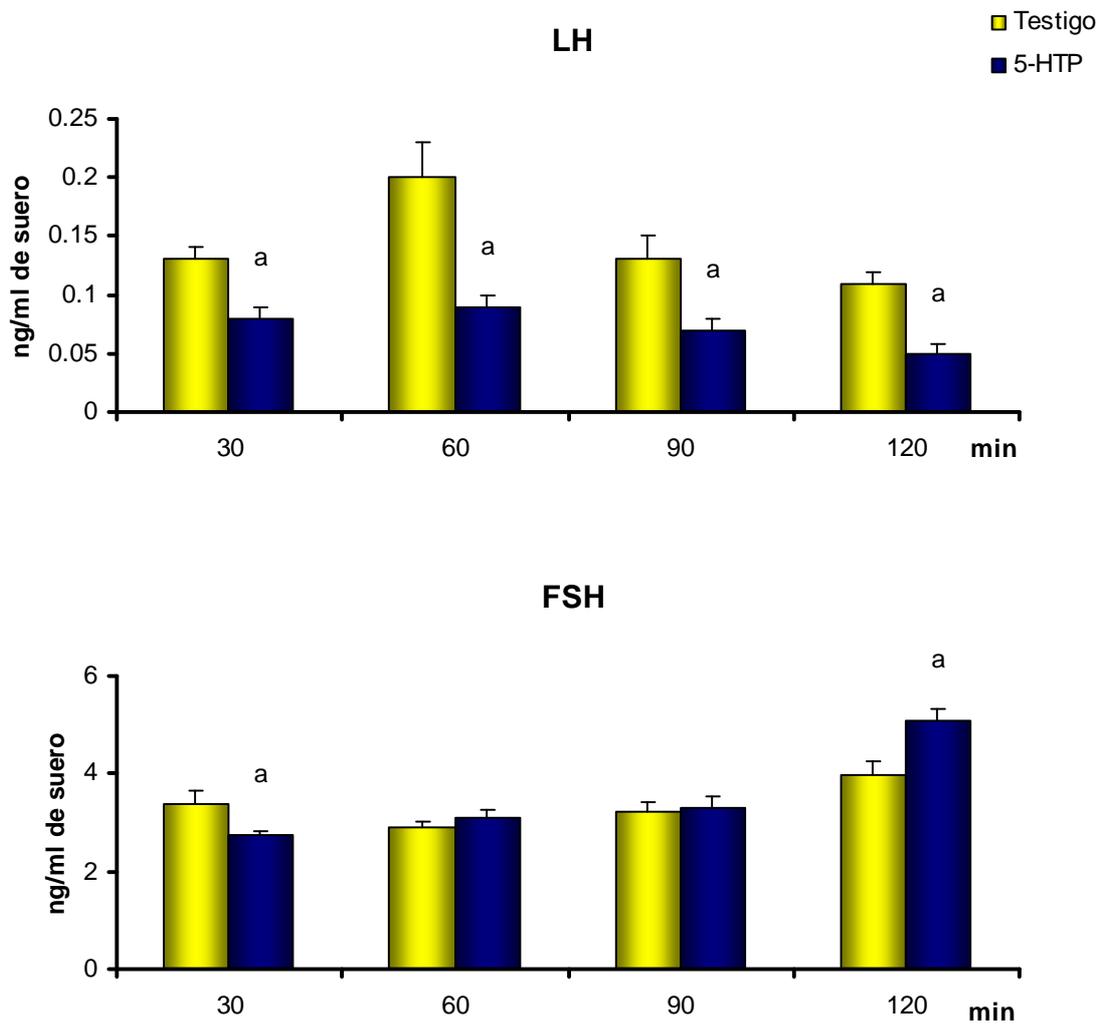
a, $p < 0.05$ vs. grupo TA+Vh (prueba de t-Student).

Figura 11.- Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA/5-HT] en el hipotálamo medio de ratas testigo o tratadas con 100 mg/kg de p.c. de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y sacrificadas a diferentes tiempos.



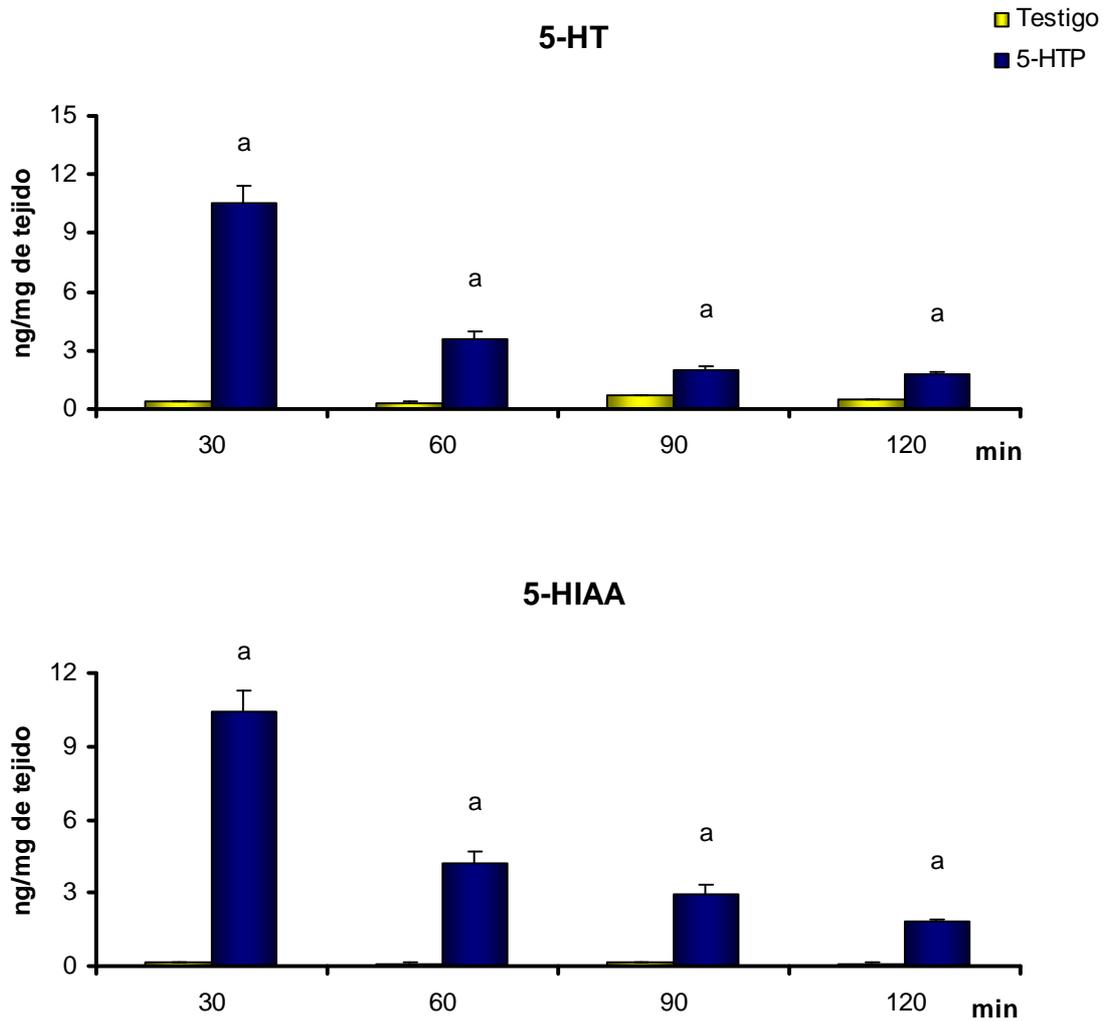
a, $p < 0.05$ vs. grupo TA+Vh (prueba de t-Student).

Figura 12.- Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis de ratas testigo o tratadas con 100 mg/kg de p.c. de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y sacrificadas a diferentes tiempos.



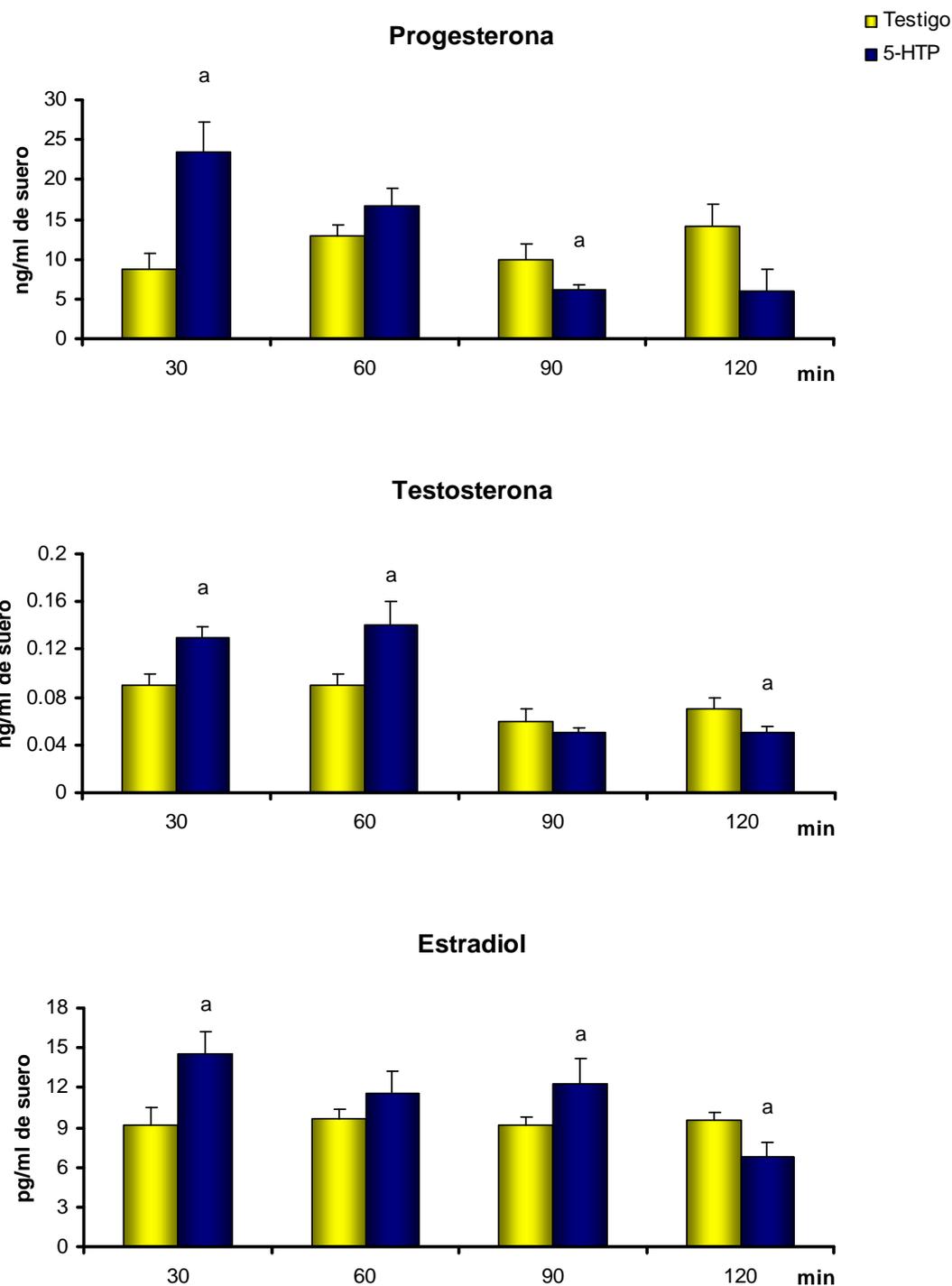
a, $p < 0.05$ vs. grupo TA+Vh (prueba de t-Student).

Figura 13.- Concentración (media \pm e.e.m.) de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona folículo estimulante (FSH) en el suero de ratas testigo o tratadas con 100 mg/kg de p.c. de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y sacrificadas a diferentes tiempos.



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA+Vh (prueba de t-Student).

Figura 14.- Concentración (media \pm e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario de ratas testigo o tratadas con 100 mg/kg de p.c. de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y sacrificadas a diferentes tiempos.



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA+Vh (prueba de t-Student).

Figura 15.- Concentración (media \pm e.e.m.) de progesterona , testosterona y estradiol en el suero de ratas testigo o tratadas con 100 mg/kg de p.c. de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) y sacrificadas a diferentes tiempos.

Cuadro 1. Resumen de resultados observados en los animales tratados con 5-hidroxitriptofano por vía sistémica.

| | | 30 min | 60 min | 90 min | 120 min |
|--|----------------------|--------|--------|--------|---------|
| Hipotálamo Anterior y Medio | 5-HT | - | ↑ | ↑ | - |
| | 5-HIAA | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Hipófisis | 5-HT | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| | 5-HIAA | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Gonadotropinas | LH | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| | FSH | ↓ | - | - | ↑ |
| Ovario | 5-HT | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| | 5-HIAA | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Hormonas Esteroides | P₄ | ↑ | - | ↓ | - |
| | T | ↑ | ↑ | - | ↓ |
| | E₂ | ↑ | - | ↑ | ↓ |

6.2 Efecto de la Administración de 5-Hidroxitriptofano en Bursa del Ovario.

6.2.1 Concentración de Gonadotropinas.

En comparación con el grupo intacto, en los animales que se les inyectó solución salina (Vh), la concentración de LH en los dos grupos estudiados fue menor (figura 16), mientras que la de FSH fue mayor en los animales sacrificados a los 60 minutos postratamiento. En los animales que se les administró el 5-hidroxitriptofano, la concentración de LH fue menor al grupo intacto en los dos periodos estudiados. La concentración de FSH fue mayor a los 60 minutos postratamiento (figura 16).

6.2.2 Concentración de 5-HT y 5-HIAA en el Ovario.

En los animales que se trataron con Vh la concentración de 5-HT fue mayor a los 60 minutos y del 5-HIAA en los dos periodos estudiados. En los animales que se inyectó el 5-hidroxitriptofano la concentración de 5-HT y del 5-HIAA fue mayor a los 60 y 120 minutos en comparación con la del grupo intacto y al tratado con Vh (figura 17).

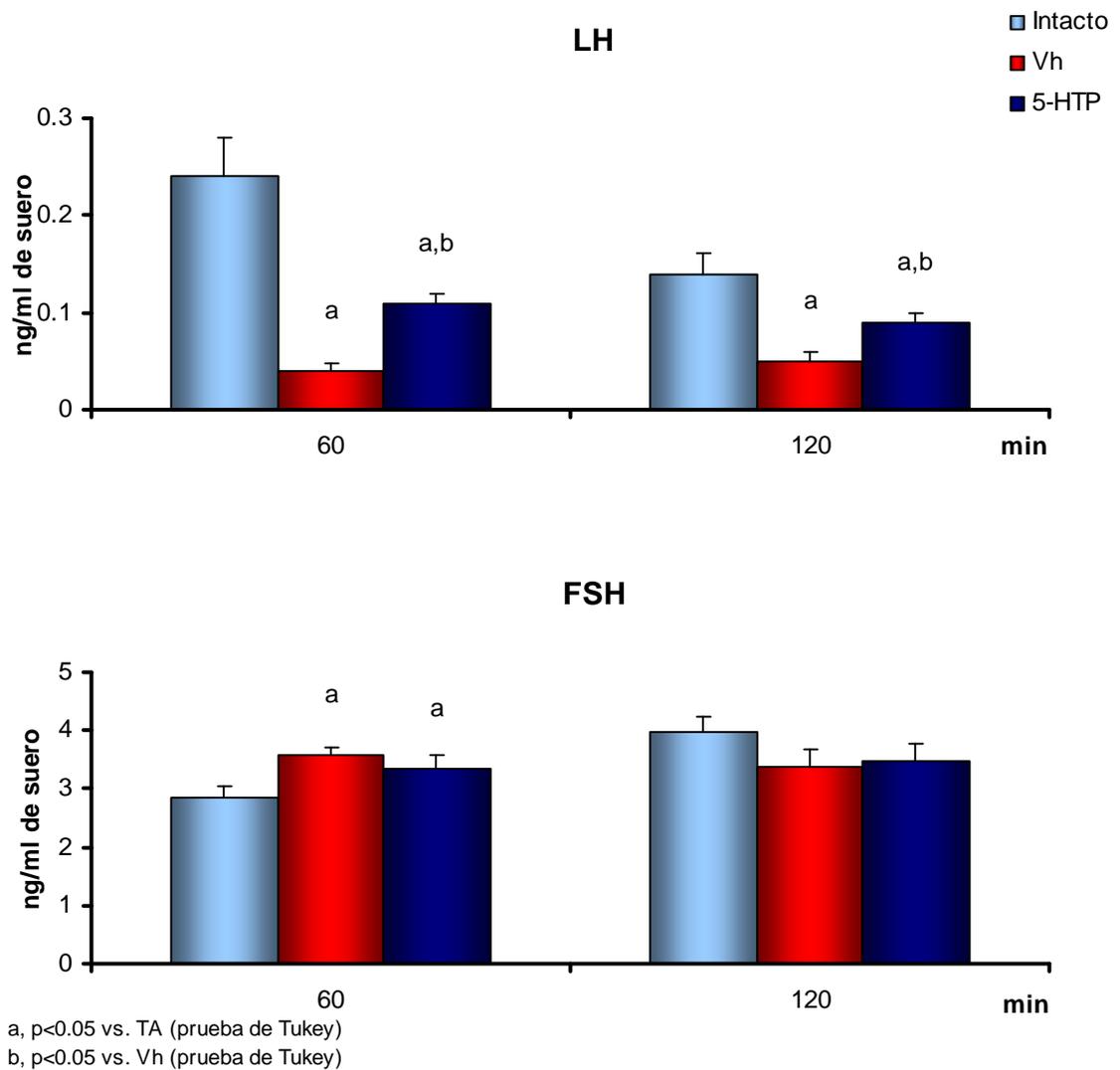


Figura 16.- Concentración (media±e.e.m.) de hormona luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH) en el suero de ratas intactas, tratadas con solución salina (Vh) o con 0.0015 mg/40 µl de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) en bursa del ovario y sacrificadas a los 60 ó 120 minutos.

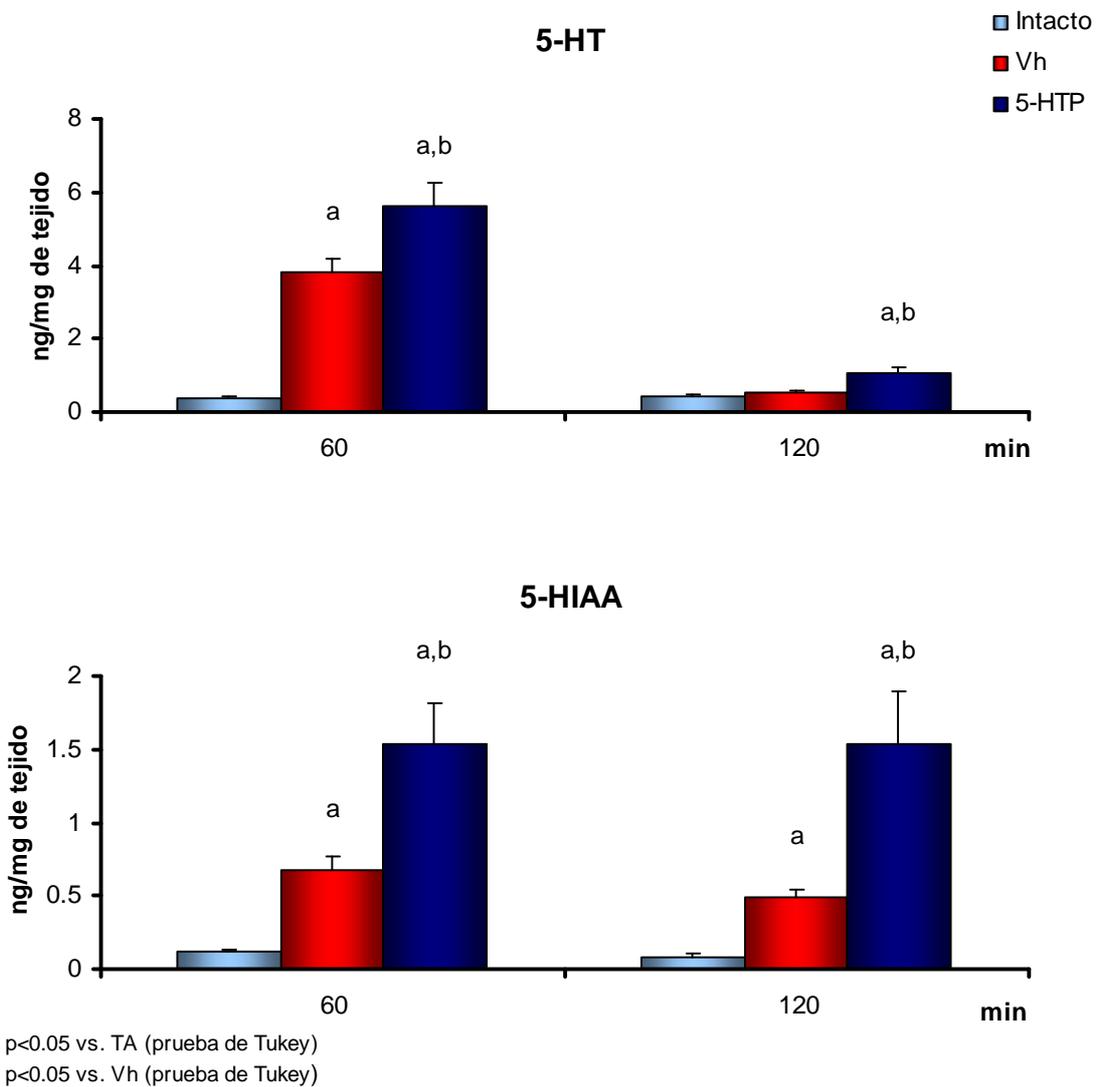


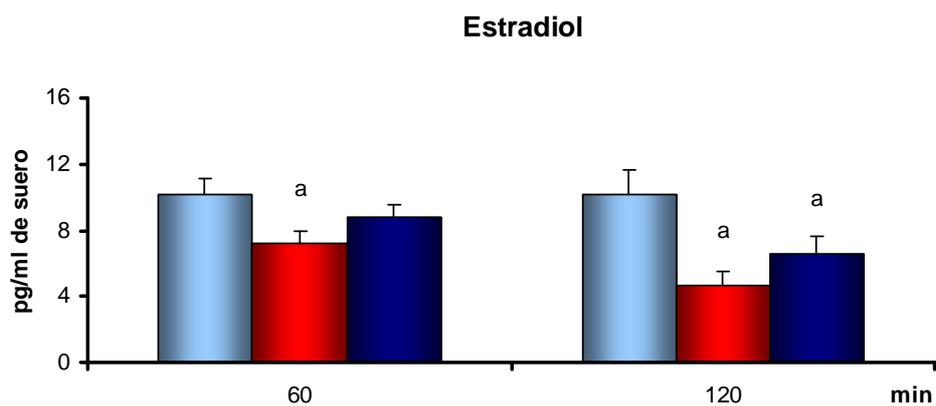
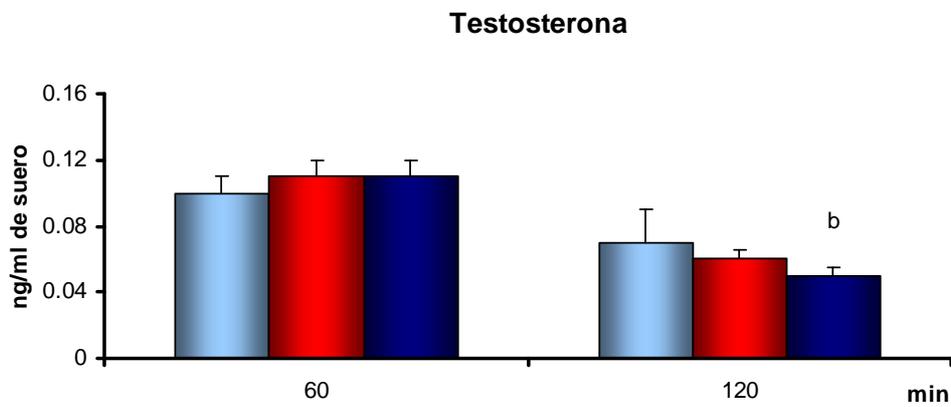
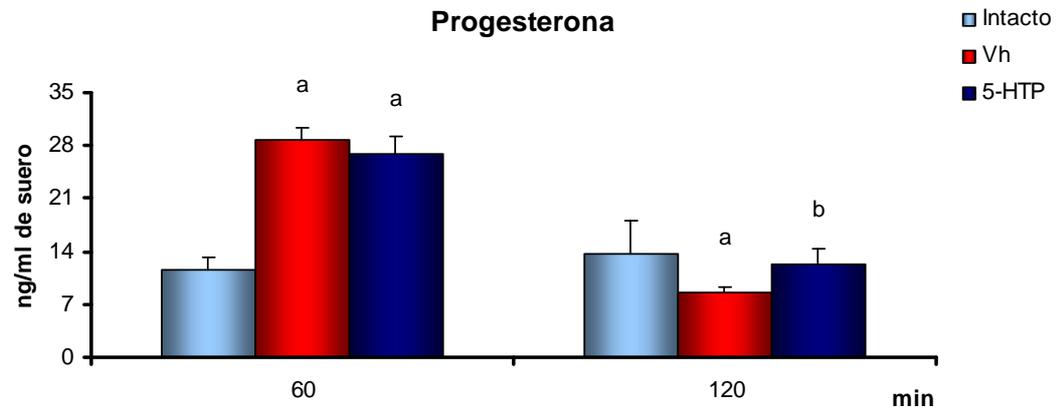
Figura 17.- Concentración (media±e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario de ratas intactas, tratadas con solución salina (Vh) o con 0.0015 mg/40 µl de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) en bursa del ovario y sacrificadas a los 60 ó 120 minutos.

6.2.3 Concentración de Hormonas Esteroides

En comparación con el grupo intacto, en los animales que se les inyectó el Vh o en los tratados con el 5-hidroxitriptofano, la concentración de progesterona en suero fue mayor a los 60 minutos, mientras que en los sacrificados a los 120 minutos fue significativamente menor (figura 18).

En comparación con el grupo intacto la concentración de testosterona en el suero de los animales tratados con Vh no se modificó. A los animales que se les administró el 5-hidroxitriptofano, sacrificados a los 120 minutos, la concentración de testosterona fue menor en comparación con el grupo de animales tratado con Vh (figura 18).

En comparación con el grupo intacto, en el suero de los animales a los que se les inyectó el Vh, la concentración de estradiol fue menor en los dos periodos estudiados, mientras que en los animales tratados con 5-hidroxitriptofano la concentración de esta hormona fue menor a los 120 minutos (figura 18).



a, $p < 0.05$ vs. TA (prueba de Tukey)
 b, $p < 0.05$ vs. Vh (prueba de Tukey)

Figura 18.- Concentración (media \pm e.e.m.) de progesterona, testosterona y estradiol en el suero de ratas intactas, tratadas con solución salina (Vh) o con 0.0015mg/40 μ l de 5-hidroxitriptofano (5-HTP) en la bursa del ovario y sacrificadas a los 60 ó 120 minutos.

Cuadro 2. Resumen de resultados observados en los animales tratados con 5-hidroxitriptofano en la bursa del ovario.

| | | Vh | | 5-HTP | |
|----------------------------|----------------------|--------|---------|--------|---------|
| | | 60 min | 120 min | 60 min | 120 min |
| Gonadotropinas | LH | ↓ | ↓ | ↓ | ↓ |
| | FSH | ↑ | - | ↑ | - |
| Ovario | 5-HT | ↑ | - | ↑ | ↑ |
| | 5-HIAA | ↑ | ↑ | ↑ | ↑ |
| Hormonas Esteroides | P₄ | ↑ | ↓ | ↑ | - |
| | T | - | - | - | - |
| | E₂ | ↓ | ↓ | - | ↓ |

7. DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos de este estudio permiten sugerir que en la rata hembra prepúber, la serotonina participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hecho de que en los animales que se trataron con el precursor de la síntesis de serotonina, el 5-hidroxitriptofano vía sistémica se incrementara la concentración de serotonina en el hipotálamo, hipófisis y ovario y que esto se acompañara del aumento en la concentración sérica de progesterona a los 30 minutos y del estradiol a los 30 y 90 minutos, apoyan esta idea.

En estudios anatómicos se ha mostrado que la inervación serotoninérgica del hipotálamo anterior y medio se originan del núcleo del rafé. Este núcleo está conformado por neuronas que tienen la capacidad de incorporar el triptofano o 5-hidroxitriptofano y su biotransformación a serotonina (Frazer y Hensler, 1999). La administración del 5-HTP incrementa la concentración de serotonina en algunas regiones del encéfalo (Ruddick y col., 2006) y en el líquido cefaloraquídeo de la rata (Young y Teff, 1989). Cuando se ingiere el triptofano en la dieta, o se administra vía sistémica, es transportado de la circulación sistémica al encéfalo debido a que atraviesa la barrera hematoencefálica y se incorpora a las neuronas serotoninérgicas, entre otros tipos de células, como los astrositos para la síntesis de kinurenina por ejemplo (Ruddick y col., 2006; Fernstrom y Wurtman, 1971; Fernstrom, 1983). Estas evidencias coinciden con lo observado en nuestro estudio, debido a que en el hipotálamo de los animales tratados con el 5-hidroxitriptofano, la concentración de la amina fue mayor, lo que indica una mayor síntesis de la amina.

Si bien, tanto en el hipotálamo como en la hipófisis y el ovario se observó el incremento en la síntesis de serotonina por la administración del 5-HTP. El tiempo en el que se presentó este evento depende del órgano, ya que en la hipófisis y el ovario se observó a los 30 minutos y en el hipotálamo hasta los 60 minutos. Es probable que esta diferencia este relacionada con la velocidad de

incorporación del triptofano a los órganos. En apoyo a esta idea Ruddick y colaboradores (2006) mostraron que la disponibilidad del aminoácido en el sistema nervioso central depende de diferentes mecanismos, como la tasa de transporte del triptofano a través de la barrera hematoencefálica. Aproximadamente el 90 % del triptofano se une a la albúmina formando un complejo que no cruza la barrera hematoencefálica (McMenamy, 1965), y por lo tanto se requiere la disociación del triptofano de la albúmina en la microcirculación de la barrera hematoencefálica para que el aminoácido se incorpore a diferentes tipos celulares del encéfalo, como las neuronas serotoninérgicas (Pardridge y Fierer, 1990). Con base en estas evidencias y nuestros resultados es probable que la incorporación del precursor de la serotonina fue en un tiempo más corto en la hipófisis y en el ovario, mientras que en el hipotálamo fue más lenta debido a lo antes mencionado.

Otra posibilidad es que la actividad de las isoformas de la triptofano hidroxilasa presente en el encéfalo sea diferente a la que se encuentra en tejidos periféricos, como la hipófisis y el ovario. Una de las evidencias que apoyan esta idea, es el hecho de que en el encéfalo se encuentra la isoforma TPH2 y en tejidos periféricos la TPHa (Walter y Bader, 2003). Además, la TPH1 tiene una afinidad mayor por el triptofano que la TPH2 (Nakamura y Hasegawa 2007; Nakamura y col., 2006).

El hecho de que en los animales tratados con el 5-HTP también se observará una mayor concentración del 5-HIAA, indica que se incrementó tanto la síntesis como la actividad de este neurotransmisor. El aumento en la concentración del 5-HIAA en el hipotálamo nos permite pensar que conforme se sintetiza la serotonina, parte de este neurotransmisor se une a sus receptores en las neuronas postsinápticas y la que queda libre en la hendidura es recapturada por la terminal serotoninérgica y aquí bajo la acción de la MAOA es metabolizada a 5-HIAA. El aumento en la concentración de este metabolito en el hipotálamo de los animales tratados con el precursor, nos indica una mayor actividad de las neuronas serotoninérgicas, como se observa en los animales

sacrificados a los 30 minutos. (Kerdelhué y col., 1989) (Shannon y col., 1986) sugieren que el incremento de la relación [5-HIAA/5-HT] es un indicador de mayor actividad del sistema serotoninérgico.

Nuestros resultados muestran que el aumento en la síntesis y metabolismo de la serotonina inducido por la administración del 5-HTP es más evidente a los 60 minutos postratamiento, lo cual coincide con lo observado por otros autores en la rata hembra y macho (Moguilevsky y col., 1985; Justo y col., 1989).

El incremento en la concentración del 5-HIAA en el hipotálamo de los animales que recibieron el 5-HTP, indica una mayor actividad del sistema serotoninérgico, el hecho que esto se acompañara de la disminución en la secreción de LH en el suero de estos animales, indica que en la rata hembra prepúber la serotonina inhibe la secreción de la LH. Este efecto inhibitorio posiblemente es el resultado de la acción de la amina en las neuronas del hipotálamo que secretan la GnRH hacia la hipófisis.

La disminución en la secreción de LH observada en los animales tratados con el 5-HTP, posiblemente también es el resultado de que la serotonina actuó directamente en la hipófisis inhibiendo la secreción de la gonadotropina. Esta idea se apoya en el hecho de que en la hipófisis de estos animales la síntesis de serotonina también se incrementó. Existen evidencias de que en la hipófisis existen fibras serotoninérgicas que se originan en el núcleo medial del rafé (Baumgarten y Grozdanovic, 2000; Montagne y Calas, 1988), lo que explica el incremento en la concentración de la serotonina en esta glándula. También se ha mostrado que los gonadotropos tiene la capacidad de incorporar la serotonina (Jennes y col., 1985).

Al parecer la serotonina ejerce un efecto inhibitorio en la secreción de la LH, mientras que sobre la secreción de FSH inicialmente sería inhibitoria y posteriormente estimulante. Este efecto diferencial que ejerce la serotonina en la regulación de la secreción de las gonadotropinas ha sido mostrado en la

hembra y el macho (Arias y col., 1990; Moguilevsky y col., 1985; Justo y col., 1989). Las neuronas que se localizan en el área preóptica proyectan sus axones a la región anterior y media de la eminencia media y liberan LHRH, las neuronas de la región dorsal anterior del hipotálamo envían sus axones a la región media y posterior de la eminencia media y liberan FSHRH (McCann y col., 2002). Con base en nuestros resultados y los de otros autores se apoya la idea de que existen dos factores liberadores para las gonadotropinas

No existe una correlación entre la disminución en la concentración de LH y los cambios en la concentración de progesterona y testosterona en el suero de los animales tratados con el precursor.

La LH estimula la transformación del colesterol a pregnenolona en las células de la teca del folículo ovárico y a partir de este esteroide se forma la progesterona (Gore-Langton y Armstrong, 1994). En nuestro estudio, la disminución en la concentración de LH observada en los animales tratados con el 5-hidroxitriptofano, no se acompañó de la disminución en la secreción de progesterona, ya que se observó un comportamiento inverso. Estos hechos nos llevan a pensar que los cambios observados en la secreción de hormonas esteroides en estos animales es el resultado de la acción de la serotonina en el ovario.

Debido a que la administración del 5-hidroxitriptofano también incrementó la concentración de serotonina en el ovario, se apoya la idea de que en el ovario existen las enzimas que participan en la biotransformación de este precursor a serotonina. Así mismo, que esta amina actúa directamente en el ovario modulando la esteroidogénesis, como lo han sugerido (Tanaka y col., 1993 y Batista y Condon, 1986).

Según la información disponible la concentración de serotonina en el ovario se incrementa en el día del estro cuando ocurre la ovulación, (Clausell y Soliman, 1978). Sin embargo, por estudios de inmunohistoquímica no se ha identificado la presencia de fibras serotoninérgicas en el ovario (Amenta y col.,

1992). La fuente de serotonina de este órgano son elementos no neuronales tales como las plaquetas y los mastocitos o en las células de la granulosa que rodean al ovocito y en el ovocito se encuentran los receptores a serotonina 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇ (Amirelout y col., 1992). Este conjunto de evidencias apoyan la acción directa de la serotonina en las funciones del ovario, como la esteroidogénesis.

Cuando el precursor de la serotonina se inyecta directamente en la bursa del ovario, también se observa un incremento en la síntesis de la amina y del metabolito, lo que nos indica que en la gónada se lleva a cabo la síntesis y metabolismo de la serotonina. Sin embargo, este comportamiento también se observó en los animales que recibieron Vh en bursa del ovario, pero en menor proporción. Hasta el momento no existen evidencias de la presencia de fibras serotoninérgicas en el ovario. Por lo que no tenemos una explicación a los cambios en la síntesis y metabolismo de la amina observados en la gónada.

Con base en los cambios observados en la concentración de serotonina en el ovario y en la concentración de progesterona y estradiol, es posible que la modificación de alguna de las vías neurales que llegan al ovario, al realizar la microinyección del Vh o del 5-HTP, se refleje en modificaciones en la esteroidogénesis. Esta vía posiblemente es la que transcurre por el nervio ovárico superior o el plexo ovárico. El ovario recibe inervación simpática y parasimpática (Dissen y col., 1993; Gerendai y col., 2002; Lawrence y Burden, 1980). En el primer tipo se encuentra el nervio ovárico superior que llega al polo superior del ovario acompañando al ligamento suspensorio y penetra a la gónada por el hilum (Aguado, 2002). El segundo tipo de inervación la recibe el ovario del nervio vago (Lawrence y Burden, 1980). Además se ha mostrado que esta inervación participa en la regulación de la esteroidogénesis (Kawakami y col., 1981, Morán y col., 2003).

8. CONCLUSIONES

- En la hembra prepúber, la serotonina modula de manera diferencial en la regulación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de gonadotropinas.
- En la rata hembra prepúber, la serotonina inhibe la secreción de la LH y estimula la de FSH
- La serotonina actúa directamente sobre el ovario donde estimula la secreción de progesterona, testosterona y estradiol.

9. BIBLIOGRAFÍA

1. Abbott DH, Padmanabhan V, Dumesic DA. (2008). Contributions of androgen and estrogen to fetal programming of ovarian dysfunction. **Reproductive Biology and Endocrinology** **4 (17)**; 1-8.
2. Aguado LI. (2002). Role of the central and peripheral nervous system in the ovarian function. **Microscopy Research and Technique** **59**; 462-473.
3. Amenta F, Vega JA, Ricci A, Collier WL. (1992). Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. **Anatomical Record** **233 (3)**; 478-484.
4. Amireault P, Dubé F. (2005). Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus-oocyte complex. **Molecular Pharmacology** **68 (6)**:1678-1687.
5. Amireault P, Dubé F. (2005). Serotonin and antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. **Biology of Reproduction** **73**; 358-365.
6. Aragón MA, Ayala ME, Marin M, Aviles A, Matsumura PA, Domínguez R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. **Reproduction** **129**; 717-727.
7. Arias P, Szwarcfarb B, de 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 (1)**; 57-61.
8. Ayala ME, Monroy J, Morales L, Castro ME, Domínguez R. (1998). Effects of a lesion in the dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period of the female rat, on puberty. **Brain Research Bulletin** **47**; 211-218.
9. Barnes NM, Sharp T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. **Neuropharmacology** **38**; 1083–1152.

10. Battista PJ, Condon WA. (1986). Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow luteal cells in vitro. **Journal of Reproduction and Fertility** **76**; 231-238.
11. Battista PJ, Rexroad Jr CE, Condon WA. (1987). Mechanisms involved in the action of serotonin-induced stimulation of progesterone production by bovine luteal cells in vitro. **Molecular and Cellular Endocrinology** **51 (1-2)**; 145-151.
12. Baumgarten HG, Göthert M. (2000). Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Edit. Springer Study, USA. Pp 20- 150.
13. Baumgarten HG, Grozdanovic A. (2000). Anatomy of central serotonergic projection system. En: H. G. Baumgarten and M. Gothert (Eds.). Serotonergic neurons and 5-HT receptors in the CNS. Edit. Spring Press Alemania. Pp. 193-203.
14. Berkholtz CB, Shea LD, Woodruff TK. (2006). Extracellular matrix functions in follicle maturation. **Seminars in Reproductive Medicine** **24 (4)**; 262–269.
15. Bodis J, Hartmann G, Torok A, Bogнар Z, Tinnberg HJ, Cledon P, Hanf V. (1993). Relationship between the monoamine and gonadotropin content in follicular fluid of preovulatory follicular fluid of preovulatory graafian follicles after superovulation treatment. **Experimental and Clinical Endocrinology** **101**; 178-182.
16. Boldrinia M, Underwooda MD, Manna JJ, Arangoa V. (2008). Serotonin-1A autoreceptor binding in the dorsal raphe nucleus of depressed suicides. **Journal of Psychiatric Research** **42**; 433–442.
17. Boya JU. (1999). Atlas de histología y organografía microscópica. Edit. Panamericana. Madrid, España. Pp. 418.
18. Brown RE. (1994). The pituitary gland and its hormones. En: Neuroendocrinology. Richard E. Brown (Ed). Edit. Cambridge University Press. New York. Pp. 30- 39.
19. Carretti N, Florio P. Reiss FM, Comai S, Petraglia F, Costa CVL. (2007). Menopause alters the metabolism of serum serotonin precursors and

- their correlation with gonadotropins and estradiol. **Climateric 10**; 393-399.
20. Chabrolle C, JeanPierre E, Tosca L, Ramé C, DuPont J. (2008) Effects of high levels of glucose on the steroidogenesis and the expression of adiponectin receptors in rat ovarian cells. **Reproductive Biology and Endocrinology 6 (11)**; 1-14.
21. Chaouloff F, Kennett GA, Serrurier B, Merino D, Curzon G. (1986). Amino acid analysis demonstrates that increased plasma free tryptophan causes the increase of brain tryptophan during exercise in the rat. **Journal of Neurochemistry 46**; 1647-1650.
22. Chern BY, Chen YHJ, Hong LS, LaPolt PS. (2000). Ovarian steroidogenic responsiveness to exogenous gonadotropin stimulation in young and middle-ages female rats. **Pharmacological Reviews 59**; 360–417.
23. Clausell DE, Soliman KE. (1978). Ovarian serotonin content in relation to ovulation. **Experientia 34**; 410-411.
24. Curzon G, Friedel J, Knott PJ. (1973). The effect of fatty acids on the binding of tryptophan to plasma protein. **Nature 242**; 198-200.
25. Dissen, G.A. Hill DF, Dess WL, Ojeda SR. (1993). Neural and neurotrophic control of ovarian development. En: E. Y. Adashi and P.C.K. Leung (Edits.). New York, EUA. Raven Press. The ovary (1-19).
26. Domínguez R. (1991). Tópicos selectos de biología de la reproducción. Edit. Miguel Angel Porrúa. 1ªed. México. Capítulo 7: 160-179.
27. Domínguez R, Cruz ME, Morán C. (1998). Differential effects of ovarian local anaesthesia during pro-oestrus on ovulation by the right or left ovary in normal and hemi-ovariectomized adult rats. **Journal of Reproduction and Fertility 113**; 185-290.
28. Donnersberger AB, Lesak AE. (2002). Libro de laboratorio de anatomía y fisiología. Edit. Paidotribo. Barcelona, España. Pp. 211-214, 443-451.
29. Erickson GF, Shimasaki S. (2001). The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertility and Sterility 76**; 943-948.

-
30. Erspamer V, Asero B. (1952). Identification of enteramine, the specific hormone of the enterochromaffin cell system, as 5-hydroxytryptamine. **Nature** **169**; 800–801.
 31. Espinosa VM, Sánchez Santos SA. (2005). PAC-GO1 Obstetricia. Edit. Intersistemas 2ªed. Capítulo 5: 24-55.
 32. Fernstrom JD. (1983). Role of precursor availability in control of monoamine biosynthesis in brain. **Physiological Reviews** **63**; 484-546.
 33. Fernstrom JD, Wurtman RJ. (1971). Brain serotonin content physiological dependence on plasma tryptophan levels. **Science** **173**; 149-152.
 34. Fernstrom SD, Fernstrom MH. (2006). Exercise serum free tryptophan and central fatigues. **Journal of Nutrition** **136**; 5535-5595.
 35. Fink KB, Göthert M. (2007). 5-HT Receptor regulation of neurotransmitter **Release Pharmacology Reviews** **59 (4)**; 360–417.
 36. Forzard JR. (1984). Neuronal 5-HT receptors in the periphery. **Neuropharmacology** **12 (B)**; 1473-1486.
 37. Frazer A, Hensler JG. (1999). Basic neurochemistry molecular, cellular and medical aspects. Edit. Lippincott Williams and Wilkins. 6ª ed. USA. New York. Pp. 238-319.
 38. 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. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
 39. Geneser F. (2000). Histología sobre bases biomoleculares. Edit. Médica Panamericana 3ª ed. Buenos Aires, Argentina. Pp. 613-629.
 40. Gerendai I, Kocsis K, Halasz B. (2002). Supraspinal connections of the ovary: Structural and functional aspects. **Microscopy Research and Technique** **59**; 474-483.
 41. Gore-Langton RE, 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.

-
42. Green RA. (2006). Neuropharmacology of 5-hydroxytryptamin. **British Journal of Pharmacology** **147**; S145–S152.
 43. Guraya S. (2000). Comparative cellular and molecular biology of ovary in mammals. Edit. Science Publishers, Inc. USA. Pp. 76-115.
 44. Hasegawa H, Yamagisawa M, Inoue F, Yanaiha N, Ichiyama N. (1987). Demostration of non-neural tryptophan 5-mono-oxygenase in mouse intestinal mucosa. **Biochemistry Journal** **248**; 501-509.
 45. Haseltine FP, Findlay JK. (1991). Growth factors in fertility regulation (Scientific Basis of Fertility Regulation). Edit. Cambridge University Press. England. Pp; 79-96.
 46. Hirshfield A. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. **International Review of Cytology** **124**; 43-101.
 47. Homberg JR, Schiepers OJ, Schoffelmeer AN, Cuppen E, Vanderschuren LJ. (2007). Acute constitutive increases in central serotonin levels reduce social play behaviour in peri-adolescent rats. **Psychopharmacology** **195**; 175–182.
 48. Huang YJ, Maruyama Y, Lu KS, Pereira E, Plonsky I, Baur JE, Wu D, Roper SD. (2005). Mouse taste buds use serotonin as a neurotransmitter. **The Journal of Neuroscience** **25**; 843-847.
 49. Jackson JC, Cross RJ, Walker RF, Markerberry WR, Brooks WH, Roszman TF. (1985). Influence of serotonin on the immune response. **Immunology** **54**; 505-512.
 50. Jahn G.A, Deis RP. (1988). Effect of serotonin antagonists on prolactin and progesterone secretion in rats: evidence that stimulatory release may be mediated through different receptors. **Journal of Endocrinology** **117**; 415-422.
 51. Jamnongjit M, Hammes SR. (2005). Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals raise them. **Cell Cycle** **5**; 1178–1183.
 52. 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.
53. Jennes L, Stumpf WE, Sheedy ME. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. **Journal of Comparative Neurology** **232 (4)**; 534-547.
54. Justo SN, Rossano GL, Szwedfarb B, Rubio mCm, 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.
55. Kannisto P, Owman C, Schmidt G, Sjöberg NO. (1987). Characterization of presynaptic 5-HT receptors on adrenergic nerves supplying the bovine ovarian follicle. **British Journal of Pharmacology** **92(3)**; 487-497.
56. Kawakami M, Hayashi R, Kubo K, Nagase M, Uekura T. (1981). Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. **Endocrinology** **109**; 136-145.
57. Kerdelhué B, Bajda F, Lesiur P, Pasgvalini C, El Abed A, Lenoir V, Daviller P, Chiveh MC, Palkovits M. (1989). Median eminence dopamine and serotonin neural activity. **Neuroendocrinology** **49**; 176-180.
58. Koe BK. (1971). Tryptophan hydroxylase inhibitors. **Federation Proceedings** **30**; 886-896.
59. Kotsuji F, Kamitani N, Goto K, Tominaga T. (1990). Bovine theca and granulosa cell Interactions modulate their growth, morphology and function. **Biology of Reproduction** **43**; 726-732.
60. Lawrence IE., Burden HW. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. **Anatomical Record** **196**; 51-59.
61. Lucidi P, Bernabò N, Turriani M, Barboni B, Mattioli M. (2003). Cumulus cells steroidogenesis is influenced by the degree of oocyte maturation. **Reproductive Biology and Endocrinology** **1 (45)**; 1-9.
62. Madras BK, Cohen EL, Messing R, Munro HN, Wurtman RJ. (1974). Relevance of free tryptophan in serum to tissue tryptophan concentrations. **Metabolism** **23**; 1107-1116.

-
63. McCann SM, Karanth S, Mastronardi CA, Dees WL, Childs G, Miller B, Sower S, Yu WH. (2002). Hypothalamic control of gonadotropin secretion. In: I.S. Parhar (Ed.). **Progress in Brain Research 141**; 151-164.
64. McMenemy RH. (1965). Binding of indole analogues to human albumin. Effects of fatty acids. **Journal of Biological Chemistry 240**; 4235-4243.
65. Merck. (2005). The Merck Index. Edit. Merck Manual 13^a ed. Pp 19585-19586.
66. Miura H, Ozaki N, Sawada M, Isobe K, Ohta T, Nagatsu T. (2008). A link between stress and depression: Shifts in the balance between the kynurenine and serotonin pathways of tryptophan metabolism and the etiology and pathophysiology of depression. **Stress 11**; 198 – 209.
67. Moguelevsky JA, Faigón MR, Scacchia P, Szwarcfarb B. (1985). Effect of the serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepuberal female rats. **Neuroendocrinology 40**; 135-138.
68. Monroy J, Ayala ME, Chavira R, Damián-Matsumura P, Domínguez R. (2003). Comparative effects of injecting 5,6-dihydroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty. **Brain Research Bulletin 60**; 307-315.
69. Montagne M, Calas A. (1988). Serotonin and endocrinology-the pituitary. In: N. N-Osborne and M. Hamon (Eds.). Edit. John Wiley and Sons Ltd. New York, EUA. Neuronal serotonin. Pp. 271-303.
70. Morán C, Morales L, Razo RS, Apolonio J, Quiroz U, Chavira R, Domínguez R. (2003). Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. **Life Sciences 73**; 2113-3125.
71. Morán MJ, Ayala ME, Monroy J, Damián-Matsumara P, 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.

-
72. Müller WE, Wollert U. (1975). Benzodiazepines: specific competitors for the binding of L-tryptophan to human serum albumin. **Naunyn Schmiedeberg's Archives of Pharmacology** **288**; 17-27.
73. Nakamura K, Hasegawa H. (2009). Production and peripheral roles of 5-HTP, a precursor of serotonin. **International Journal of Tryptophan Research** **2**; 37-43.
74. Nakamura K, Sugawara Y, Sawabe K, Oashi A, Tsurui H, Xiu Y, Ohtsuji, Lin OS, Nishimura H, Hasegawa H, Hirose S. (2006). Late developmental stage-specific role of tryptophan hydroxylase 1 in brain serotonin levels. **Journal of Neuroscience** **26**; 530-534.
75. Nakata H, Fujisawa H. (1982). Purification and properties of tryptophan 5-monooxygenase from rat brain-stem. **European Journal of Biochemistry** **122**; 41-47.
76. Nishizawa S, Benkelfat C, Youngs SN, Leyton M, Mzengeza S, De Montigny C, Blier P, Diksic M. (1996). Differences between males and females in rates of serotonin synthesis in human brain. **Proceedings of the National Academy of Sciences** **94**; 5308-5313.
77. Pardridge WM, Fierer G. (1990). Transport of tryptophan into brain from the circulating, albumin-bound pool in rats and in rabbits. **Journal of Neurochemistry** **54(3)**; 971-976.
78. Paxinos G, Watson C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Edit. Academic Press. New York, EUA.
79. Romero J. (2009). Efecto 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 de Licenciatura**. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.
80. Ruddick JP, Evans AK, Nutt DJ, Lightman SL, Rook GAW, Lowry ChA. (2006). Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications. **Expert Reviews** **8**; 1-27.
81. Sanne JL, Krueger KE. (1995). Expression of cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme and 3,β-hydroxysteroid dehydrogenase in the rat

- central nervous system: A study by polymerase chain reaction and In Situ hybridization. **Journal of Neurochemistry** **65** (2); 528-536.
82. Sauvat F. (2008). Immature cryopreserved ovary restores puberty and fertility in mice without alteration of epigenic Marks. **PLoS ONE** **3** (4); 1-4.
83. Schmidh G, Kannisto P, Owman C, Sjöberg NO. (1987). Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused *in vitro*?. **Acta Physiologica Scandinavica** **132**; 251-256.
84. Shannon NJ, Gunnet JW, Moore KE. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptamine neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. **Journal of Neurochemistry** **47**; 958-965.
85. Sirotkin AV. (1995). Serotonin influences hormone and cyclic nucleotide release by granulosa cells isolated from porcine ovaries. **Biogenic Amines** **11** (2); 137-146.
86. Sirotkin AV, Schaeffer HJ. (1997). Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. **Journal of Endocrinology** **154**; 1-5.
87. Tanaka E, Baba N, Toshida K, Suzuku K. (1993). Serotonin stimulates steroidogenesis in Rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. **Life Sciences** **53**; 563-570.
88. Tanis JE, Moresco JJ, Lindquist RA, Koelle MR. (2007). Regulation of serotonin biosynthesis by the G proteins Ga_o and Ga_q control serotonin signalins in caenorhabditis elegans. **Genetics** **178**; 157-169.
89. Terranova PF, Uilenbroek Jt, Sarville L, Horts D, Nakamura Y. (1990) Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia. **Journal of Endocrinology** **125** (3); 433-438.
90. Thiboutot D, Jabara S, McAllister JM, Sivarajah A, Gilliland K, Cong Z. (2003). Human skin is a steroidogenic tissue: steroidogenic enzymes and cofactors are expressed in epidermis, normal sebocytes, and an

-
- immortalized sebocyte cell line (SEB-1). **Journal of Investigative Dermatology** **120 (6)**; 905-914.
91. Tulsiani D. (2002). Introduction to Mammalian Reproduction. Edit. Kluwer Academic Publishers Group. USA. Pp 220-235.
92. Turner JH, Garnovskaya MN, Raymond JR. (2007). Serotonin 5-HT_{1A} receptor stimulates c-Jun N-terminal kinase and induces apoptosis in Chinese hamster ovary fibroblasts. **Biochimica Biophysica Acta. Molecular Cell Research** **3**; 391-399.
93. 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.
94. Veselá J, Reháč P, Mihalik J, Czikková S, Pokorný J, Koppel J. (2003). Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. **Physiological Research** **2**; 223-228.
95. Walther DJ, Bader M. (2003). A unique central tryptophan hydroxylase isoform. **Biochemical Pharmacology** **66**; 1673–1680.
96. Walther DJ, Peter JU, Bashammakh S, Hörtnagl H, Voits M, Fink H, Bader M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. **Neuroscience** **299**; 76.
97. Will R, Wyse GA, Anderson M. (2004). Physiology animal. Edit. Sinauer Associates. Sunderland, USA. Pp. 259-265, 423-445.
98. Yada H, Hosokawa K, Tajima K, Hasegawa Y, Kotsuji F. (1999). Role of ovarian theca and granulosa cell interaction in hormone production and cell growth during the bovine follicular maturation process. **Biology of Reproduction** **61**; 1480–1486.
99. Yazawa T, Mizutani T, Yamada K, Kawata H, Sekiguchi T, Yoshino M, Kajitani T, Shou Z, Miyamoto K. (2002). Involvement of cyclic adenosine 5'-monophosphate response element-binding protein, steroidogenic factor 1, and dax-1 in the regulation of gonadotropin-inducible ovarian

transcription factor 1 gene expression by follicle-stimulating hormone in ovarian granulosa cells. **Endocrinology** **144** (5); 1920–1930.

100. Yoshimoto Y, Sakumoto T, Arai R, Miyake A, Kimura H, Aono T, Tanizawa O, Maeda T. (1986). Monoamine oxidase in rat ovary during the estrous cycle. A histochemical study a new coupled peroxidatic oxidation method. **Endocrinology** **119**; 1800–1804.

101. Young SN, Teff KL. (1989). Tryptophan availability, 5-HT synthesis and 5-HT function. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry** **8**; 373-379.

Apéndice A

Receptores de serotonina y su cascada de señalización (Modificado de Fink y Göthert, 2007).

| Receptor | Localización | Cascada de señalización |
|----------|---|---|
| 5-HT1 | Sistema nervioso central, ovario, tracto intestinal | Activación de proteínas G y formación de AMPc. |
| 5-HT2 | Sistema nervioso central, cordón espinal, ovario | Activación de la proteína G, formación de fosfolipasa C. |
| 5-HT3 | Sistema nervioso central | Es un canal iónico tal que la reacción provocada por su activación no es mediada por segundo mensajero o a través de proteínas G. |
| 5-HT4 | Sistema nerviosos central, tracto gastrointestinal | Activación de proteínas G y formación de AMPc |
| 5-HT5 | Sistema nervioso central | Activación de proteínas G y formación de AMPc |
| 5-HT6 | Sistema nervioso central | Activación de proteínas G y formación de AMPc |
| 5-HT7 | Sistema nervioso central | Activación de proteínas G y formación de AMPc |

* Adenosin monofosfato cíclico AMPc

Apéndice B

Equipo de cromatografía y preparación de fase móvil

El equipo de cromatografía consistió de un detector electroquímico modelo (LC-4C) (Bioanalytical Systems, Inc. EU), una bomba isocrática modelo (250) (Perkin-Elmer, CO., Norwalk, EU.), un integrador modelo (1020) (Perkin-Elmer, CO., Norwalk, EU.), una precolumna de sílica y una columna de fase reversa C-18, con un tamaño de partícula de 10 μm de diámetro (Perkin-Elmer, CO., Norwalk, EU.).

Para la preparación de la fase móvil, se pesaron 15.75 gr de ácido cítrico ($C_6H_8O_7$) (Merck. Co. México) y se disolvieron en 460 ml de agua desionizada, se agitó y se ajustó el pH a 3 con una solución de hidróxido de sodio saturado (NaOH) (Merck. Co. México). Se pesaron 400 mg de ácido octanosulfónico (SOS) (Sigma Chemical St. Louis MO, EV.) y se agregó a la solución de ácido cítrico. Posteriormente la solución se filtró utilizando una membrana de celulosa tamaño de poro de 0.1 μm (Cuno AMF-Zetapore Mebrane). A la solución se le adicionaron 20 ml de acetonitrilo (CH_3CN) (EM-Merck, Alemania) y 21.5 ml de tetrahidrofurano ($OCH_2CH_2CH_2CH_2$) (EM-Merck, Alemania), se agitó la solución, se degasificó por 20 minutos y se colocó en el equipo de cromatografía y se bombearon 1.2 ml de fase por minuto.

Preparación de estándares de calibración

Previo a la cuantificación de los neurotransmisores se realizó una curva de calibración. Se prepararon soluciones stock de los diferentes neurotransmisores a cuantificar en una concentración de 1mg/2 ml de $HClO_4$ (Baker Co. México). Se tomaron 50 μl de cada neurotransmisor y se agregaron en un matraz aforado ámbar de 10 ml, se aforó con $HClO_4$ 0.1N en frío, se agitó y de esta mezcla se prepararon soluciones con las siguientes concentraciones; 2 ng, 1 ng, 0.5 ng y 0.1 ng.

Preparación de estándares para la elaboración de la curva de calibración del equipo de cromatografía.

| Estándar | Volumen de $HClO_4$ | Solución con la mezcla de los neurotransmisores | Solución de [2 ng] | Solución de [1 ng] |
|-----------------|---------------------------------------|--|---------------------------|---------------------------|
| 2 ng | 1200 μl | 50 μl | - | - |
| 1 ng | 500 μl | - | 500 μl | - |
| 0.5 ng | 500 μl | - | - | 500 μl |
| 0.1 ng | 900 μl | - | - | 100 μl |

Una vez preparada las soluciones estándar de los neurotransmisores, se procedió a inyectar cada una de las soluciones (0.1, 0.5 y 1.0 ng) al equipo de cromatografía. Posteriormente se realizó el ajuste por el método de regresión de mínimos cuadrados. Se aceptó como válida la calibración cuando los valores de correlación para cada neurotransmisor fue ≥ 0.98 .

Preparación de tejidos

El tejido se pesó, se colocó en un tubo eppendorf y se homogenizó en HClO_4 0.1 N frío. El volumen de HClO_4 que se agregó depende del tejido a evaluar. Las muestras homogenizadas se centrifugaron a 12000 r.p.m. durante 30 minutos a -4°C , se separó el sobrenadante y se filtró en una membrana con un diámetro de poro de $0.45 \mu\text{m}$ (milipore Bedford, MA, EU). Del filtrado se tomaron $20 \mu\text{l}$ con una jeringa Hamilton y se inyectaron en el equipo de cromatografía. Cuando se procesa la hipófisis el sobrenadante que se obtiene de la centrifugación no se filtra y se inyecta directamente al equipo de cromatografía.

Volumen de HClO_4 por estructura para el procesamiento de tejidos

| Estructura | Volumen de HClO_4 0.1N |
|---------------------|---|
| Hipotálamo Anterior | 300 μl |
| Hipotálamo Medio | 300 μl |
| Hipófisis | 150 μl |
| Ovario | 300 μl |