



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA RECAPTURA DE  
SEROTONINA EN LAS FUNCIONES DEL OVARIO EN LA  
ETAPA PREPUBERAL Y EL INICIO DE LA PUBERTAD**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JESSICA ROMERO REYES**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR.  
FES ZARAGOZA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ.  
FES ZARAGOZA, UNAM.**

**DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA.  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UAM.**

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2016.**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA RECAPTURA DE  
SEROTONINA EN LAS FUNCIONES DEL OVARIO EN LA  
ETAPA PREPUBERAL Y EL INICIO DE LA PUBERTAD**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

PRESENTA:

**JESSICA ROMERO REYES**

**TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR.  
FES ZARAGOZA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ.  
FES ZARAGOZA, UNAM.**

**DR. PABLO GUSTAVO DAMIÁN MATZUMURA.  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA, UAM.**

**MÉXICO, D.F. OCTUBRE, 2016.**



Lic. Ivonne Ramírez Wence  
Directora General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted que el subcomité de Biología Experimental y Biomedicina, del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 23 de mayo de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna, **ROMERO REYES JESSICA** con número de cuenta **300210642** con la tesis titulada "EFECTO DE LA INHIBICIÓN DE LA RECAPTURA DE SEROTONINA EN LAS FUNCIONES DEL OVARIO EN LA ETAPA PREPUBERAL Y EL INICIO DE LA PUBERTAD", bajo la dirección del Tutor Principal: **DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR**.

Presidente: DRA. MARÍA GENOVEVA GONZÁLEZ MORÁN  
Vocal: DRA. GLORIA ACACIA BENÍTEZ KING  
Secretario: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ  
Suplente: DR. JUAN MANUEL MANCILLA DÍAZ  
Suplente: DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
**"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"**  
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 05 de septiembre de 2016.

**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDÍ ARRIAGA**  
**COORDINADORA DEL PROGRAMA**

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

## **Agradecimientos**

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas UNAM**, por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Al **Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Número de Becario 239796)**, por el financiamiento recibido para la realización de mis estudios de doctorado. Y al apoyo financiero otorgado por DGAPA-PAPIIT convenio IN-223714.

Al comité tutor:

**Dra. María Elena Ayala Escobar.**

**Dr. Roberto Domínguez Casalá.**

**Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura.**

Por el apoyo brindado en todo momento durante mi formación profesional y porque gracias a cada uno de ustedes aprendí las diferentes facetas para convertirme en un investigador, en un científico.

## **Agradecimientos**

A los miembros del jurado:

Dr. Roberto Domínguez Casalá.

Dra. Gloria Acacia Benítez King.

Dra. María Genoveva González Morán.

Dr. Benjamín Floran Garduño.

Dr. Juan Manuel Mancilla Díaz.

Por dedicar su tiempo para la revisión de este trabajo y hacer valiosas observaciones para enriquecerlo.

A los M. V. Z. Adriana Altamirano Bautista, M. V. Z. Román Hernández Meza y M. V. Z. Dolores Elizabeth Guzmán Andrade responsables del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, por su valioso apoyo en el cuidado y mantenimiento de los animales de experimentación utilizados en este estudio.

Al Dr. Pablo Gustavo Damián Matzumura, responsable del Laboratorio de Endocrinología Molecular de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, por asesorarme, proporcionarme sus instalaciones y equipo para el análisis de RT-PCR.

Al Dr. Javier Esteban Jiménez Salazar, por asesorarme en el análisis de datos de RT-PCR.

A la Biól. Jessica Alemán Flores, por darme la oportunidad de enseñar y por su amistad.

Al M en C. Carlos Camilo Silva Méndez, por aquellas charlas vespertinas que evitaron que cruzara los límites de la cordura.

A la Biól. Exp. Rosa Icela García Vázquez, por los gratos momentos que hicieron fáciles tiempos difíciles.

A los compañeros presentes y pasados del laboratorio de pubertad y de la unidad de investigación en biología de la reproducción (UIBR), por hacer del trabajo un proceso aún más agradable.

## **Dedicatorias**

A **María Concepción Zárate Nieto (Mi Abue)**, me enseñaste el significado de la palabra generosidad. Me viste nacer, crecer, cumplir metas, me cuidaste, me amaste... "Porque si tienes la fortuna de conocer a alguien así, sabes que el amor incondicional existe, que no obedece a ley alguna más que al propio amor..." Este logro también es tuyo y siempre estarás conmigo.

A **Andrés (Papá)**, por el ejemplo de lucha, esfuerzo y amor que significas para mí, porque aprendí de ti que a pesar de vivir momentos hostiles se puede salir adelante.

A **Ana María (Mamá)**, por darme tu amor traducido de muchas formas, porque ahora entiendo los sacrificios que hiciste para vernos a mis hermanos y a mi crecer y desarrollarnos. Gracias Mamá.

A **Jessica Danielle**, por ser la luz de mi vida, mi amor, mi inspiración, mi principio y fin, mi todo. Quiero que sepas, que aunque muchas veces no estuve contigo, en cada momento de este proceso y en la vida estas en mi mente. Quiero enseñarte que aunque se presenten obstáculos en tu camino nunca, nunca, nunca debes rendirte, que debes trabajar por cumplir tus sueños que nadie te diga que no puedes hacerlo, quiero ayudarte a ser feliz y espero poder ser la mamá que necesitas.

A **Daniel (Pog)**, por amarme, por cuidarme, por la paciencia, comprensión y el apoyo que me has brindado para que llegara este momento, por ser mi cómplice de proyecto de vida. BP.

A **Jazmín y Jorge (Mis hermanos)**, por siempre estar juntos y unidos a pesar de nuestras diferencias.

A **Ariel y Aurora (Mis sobrinitas)**, por regalarme sus sonrisas y compartir sus alegrías conmigo.



## ÍNDICE

	Páginas
<b>Resumen</b> .....	<b>I</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>II</b>
<b>Introducción</b> .....	<b>1</b>
<b>Antecedentes</b> .....	<b>2</b>
Serotonina.....	2
Síntesis y Catabolismo de la Serotonina (5-HT) .....	3
Receptores a 5-HT .....	4
Receptor 5-HT <sub>1D</sub> .....	4
Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina (ISRS) .....	8
Pubertad .....	11
Desarrollo Folicular .....	15
Esteroidogénesis.....	20
Serotonina y su Participación en la Regulación de la Secreción de la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH) .....	21
Serotonina y Secreción de las Gonadotropinas .....	24
Serotonina y Funciones del Ovario .....	25
<b>Planteamiento del Problema</b> .....	<b>27</b>
<b>Hipótesis</b> .....	<b>28</b>
<b>Objetivo General</b> .....	<b>29</b>
<b>Objetivos Particulares</b> .....	<b>29</b>
<b>Materiales y Métodos</b> .....	<b>30</b>
Animales .....	30
Efecto de la Administración Aguda de Fluoxetina (FLX) .....	30
Efecto de la Administración Sub-crónica de FLX .....	30
Pubertad .....	30
Procedimiento de Autopsia .....	31
Estudio del Desarrollo Folicular.....	31
Evaluación de la Expresión del Receptor 5-HT <sub>1D</sub> .....	32
Cuantificación de 5-HT y del Ácido 5-Hidroxiindoleacético (5-HIAA) .....	32
Cuantificación de Gonadotropinas y Hormonas Esteroides .....	33

Análisis Estadístico .....	34
<b>Resultados .....</b>	<b>35</b>
Efecto de la Administración Aguda de FLX por Vía Intraperitoneal en la Etapa Prepuberal.....	35
Concentración de 5-HT y 5-HIAA .....	35
Concentración de Hormonas Esteroides .....	35
Estructura del Ovario .....	41
Efecto de la Administración de FLX por Vía Intraperitoneal en el Inicio de la Pubertad .....	43
Concentración de 5-HT y 5-HIAA .....	43
Inicio de la pubertad y Ovulación.....	43
Concentración de Hormonas Esteroides .....	43
Estructura del Ovario .....	50
Expresión del Receptor 5-HT <sub>1D</sub> .....	54
<b>Discusión .....</b>	<b>55</b>
<b>Conclusiones .....</b>	<b>61</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>62</b>
<b>Anexo 1 .....</b>	<b>76</b>
<b>Anexo 2 .....</b>	<b>78</b>

## Resumen

La serotonina o 5-Hidroxitriptamina (5-HT) participa en la modulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de las gonadotropinas [hormona luteinizante (LH) y estimulante del folículo (FSH)], esenciales para el mantenimiento de las funciones del ovario. También actúa como un agente mitogénico ya que al unirse al receptor 5-HT<sub>1D</sub> estimula la proliferación de las células del musculo liso, este receptor se ha identificado en el ovocito de los roedores y el humano.

La fluoxetina (FLX) es un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS). Utilizado en el tratamiento de algunas patologías mentales especialmente en niños y adolescentes. Con base en la literatura se desconocen los efectos reproductivos de la inhibición de la recaptura de 5-HT sobre las funciones del ovario. En el presente estudio se analizaron los efectos de la administración aguda y sub-crónica de FLX sobre el inicio de la pubertad, la ovulación, la concentración de serotonina (5-HT) en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, de gonadotropinas y de esteroides sexuales en el suero, la estructura del ovario y la expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub> en los ovarios de la rata. Para ello ratas de 30 días de edad fueron inyectadas por vía intraperitoneal con 5 mg/kg de FLX o solución salina al 0.9% (VH). Grupos de animales fueron sacrificados 24, 48 o 72h después (tratamiento agudo), otros grupos de animales fueron inyectados del día 30 al 33 (tratamiento sub-crónico), y se sacrificaron el día del primer estro vaginal.

El tratamiento agudo resultó en una mayor concentración de estradiol (E<sub>2</sub>) en suero a partir de las 48 y fue máxima a las 72h, mientras que en el ovario se incrementó en número de folículos sanos de la clase 1. En el caso del tratamiento sub-crónico, la concentración de 5-HT y 5-HIAA fue mayor en la hipófisis y el ovario, se retrasó la edad en la que se presentó el primer estro vaginal, disminuyó el número de ovocitos liberados, se incrementó el número de folículos que presentaron fragmentación del ovocito, así como múltiples ovocitos en un mismo folículo y se observó la tendencia a incrementar la expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub> en la gónada.

Por lo anterior, concluimos que la 5-HT participa directamente en la regulación de las funciones del ovario al incrementar la concentración E<sub>2</sub> además de aumentar el número y las características de los folículos en el ovario de los animales tratados.

**Abstract**

Serotonin participates in the regulation of the Gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and of the gonadotropins [luteinizing hormone (LH) and follicle-stimulating hormone (FSH)] secretion, essential for the maintenance of the ovarian functions. Also, acts as a mitogenic agent to promote the cellular proliferation through its union to 5-HT<sub>1D</sub> receptor, which it was identified in the oocytes of the mice and humans.

Fluoxetine (FLX) is a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs). This drug is used in the treatment of some mental diseases, particularly among children and teenagers. Based on literature review, are unknown the reproductive effects of serotonin reuptake inhibition over ovarian functions. In the present study we analyzed the effects of acute or sub-chronic administration of FLX on the onset puberty, ovulation, 5-HT concentration on the hypothalamus-pituitary-ovarian axis, gonadotropins, sexual steroids in serum, ovarian structure and the expression of the ovarian serotonin receptor 5-HT<sub>1D</sub>.

Thirty days old female rats were injected intraperitoneal with 5 mg/kg of FLX or saline solution (vehicle [VH]). Groups of animals were sacrificed 24, 48 or 72h after (acute) or from days 30 to 33 of age and were sacrificed at the first vaginal oestrus (sub-chronic).

The acute treatment induced a major concentration of E<sub>2</sub> in serum from 48 to 72h, while in the ovary it was higher the number of healthy follicles class 1. In the case of the sub-chronic treatment, the 5-HT and 5-HIAA it was higher in the pituitary and ovary, also observed a delay of the first vaginal oestrus, diminish the number of ova shed, increased the number of follicles that shown oocyte fragmentation and multiples oocytes in the same follicle, likewise identify the tendency to increase the 5-HT<sub>1D</sub> expression in the gonad.

We conclude, that the FLX participates indirectly in the regulation of the ovarian functions to increase the 5-HT concentration, E<sub>2</sub> as well as the number and characteristics of the follicles in the ovary of the animals treated.

## **Introducción**

La 5-HT participa en la regulación de las funciones del ovario (esteroidogénesis y ovulación), de la secreción de la GnRH (Smith y Jennes, 2001) y de las gonadotropinas [LH (Johns y col., 1982) y FSH (Gouveia y Rodrigues, 2004)]. La inyección sistémica de sulfato de serotonina (S5-HT) a ratas prepúberes resulta en una menor concentración de gonadotropinas y E<sub>2</sub>, y el número de ovocitos liberados lo que se acompaña de un mayor número de folículos preovulatorios en los ovarios. Con base en estos resultados Moran y colaboradores., 2012 postulan que la 5-HT regula un mecanismo neuroendocrino que modula las funciones del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Así mismo se sugiere que la participación de la 5-HT en la modulación de las funciones del ovario es de forma directa, ya que en el ovario está presente la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis, catabolismo, recaptura y degradación de la 5-HT (Amireault y Dubé, 2005; Dubé y Amireault, 2007),

Algunos desórdenes emocionales son el resultado de la disminución de la concentración de 5-HT en el sistema nervioso central (SNC). En el humano, la menor concentración de 5-HT en el fluido cerebroespinal está asociada al trastorno depresivo, cuyos síntomas mejoran con el tratamiento con fármacos que estimulan el sistema serotoninérgico (Glick, 2015).

La FLX es un ISRS el cual bloquea la actividad del transportador de 5-HT (SERT) lo que resulta en el incremento de la concentración extracelular de 5-HT. También, es un antagonista de receptores serotoninérgicos (Sánchez y Hyttel, 1999) e inhibidor de la triptófano hidroxilasa (TPH) (MacGillivray y col., 2010), enzima que interviene en la síntesis de 5-HT y de la monoaminoxidasa A (MAO-A), la cual cataboliza a la 5-HT (Fišar y col., 2010).

Los ISRS son herramientas farmacológicas comúnmente utilizadas en el tratamiento de desórdenes emocionales en la población pediátrica (Ercan y col., 2012; Emslie y col., 2015). En el caso de la FLX no se han considerado los efectos que podría generar el uso de este fármaco sobre el inicio de la pubertad. Por lo que en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración sistémica de FLX sobre las funciones del ovario en la etapa prepuberal usando la rata como modelo de estudio.

## **Antecedentes**

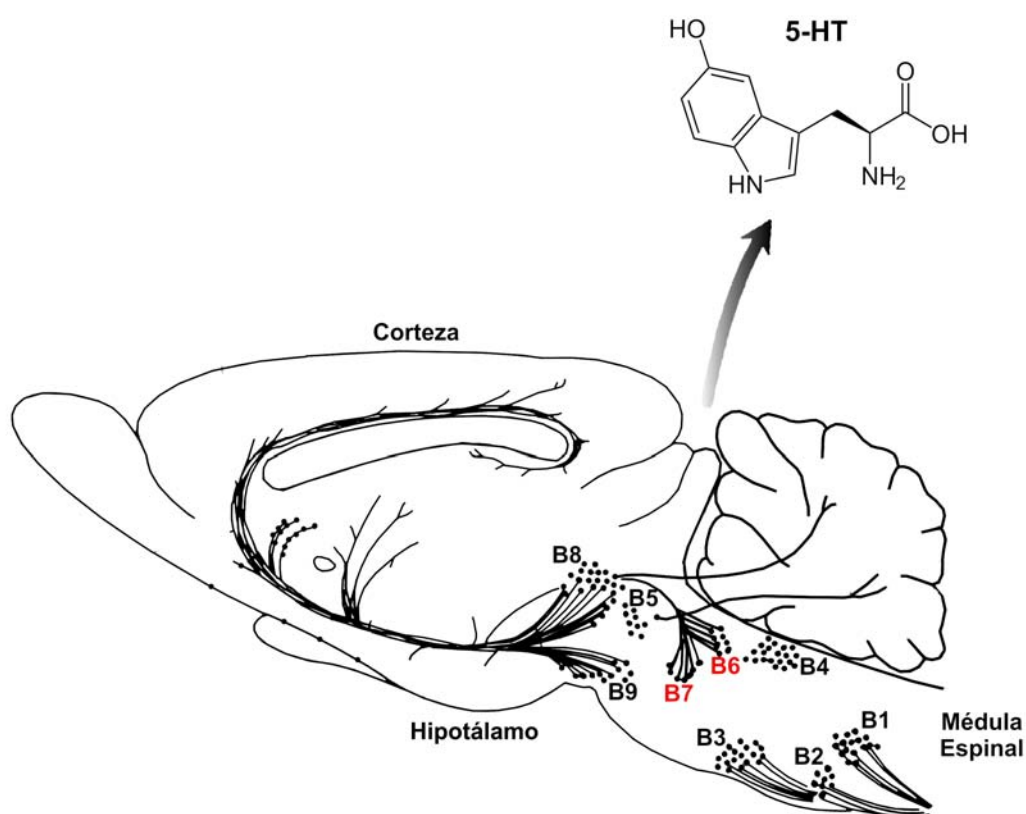
### **Serotonina**

En 1937 Vialli y Erspamer obtuvieron del extracto de células enterocromafines una sustancia que estimulaba la contracción del músculo liso del útero de la rata y a la que denominaron “enteramina”. Posteriormente, Rapport y colaboradores aislaron y caracterizaron la sustancia a partir del suero de vaca, a la cual se le denominó “serotonina” cuya estructura química es un anillo indólico con características estructurales similares a las del triptófano o la triptamina (Rapport y col., 1948).

La 5-HT es una amina biogénica que está distribuida en plantas (Kang y cols., 2007), insectos (Liu y cols., 2011) y mamíferos (Dubé y Amireaul, 2007) entre otros organismos. Cumple diversas funciones, regula los patrones del sueño (Lin y col., 2011), la ingesta de alimento (Matos-Feijó y col., 2011), el estado de ánimo, el comportamiento sexual, el flujo sanguíneo (Linder y col., 2007), la diferenciación y proliferación celular (Klempin y col., 2010), así como la secreción de hormonas por la hipófisis (Cortés, 2009).

En el sistema nervioso central (SNC) los somas de las neuronas que sintetizan 5-HT se encuentran en el cerebro medio y forman parte de los núcleos del rafe: dorsal, medial y del puente, que se identifican de B1 a B9. Los grupos B1-B3 constituyen el núcleo del puente (NP) e inervan la medula espinal., los núcleos B6 y B7 forman el núcleo dorsal del rafe (NDR) y envían sus proyecciones hacia la corteza cerebral e hipotálamo entre otras estructuras, mientras que los grupos B8 y B9 forman el núcleo medial del rafe (NMR) que inerva el hipocampo, hipotálamo y otras regiones (Figura 1) (Dahlström y Fuxe, 1964).

En los vertebrados, la 5-HT también es sintetizada por la glándula pineal así como en tejidos y órganos periféricos como las gónadas (Abraham y col., 1987; Smith, 1996). En el ovario y testículo la 5-HT participa en la regulación de la esteroidogénesis y producción de gametos (Battista y col., 1986; Bódís y col., 1992; Aragón y col., 2005; Morán y col., 2012).



**Figura 1. Esquema representativo de la localización de los cuerpos celulares que forman el rafe.** Las neuronas serotoninérgicas envían sus proyecciones a diferentes estructuras del encéfalo (ej. hipotálamo, corteza, médula espinal). B1-B3 constituyen el núcleo del puente (NP), B6 y B7 forman el rafe dorsal (NDR), B8 y B9 constituyen el núcleo medial del rafe (NMR). (Modificado de Wilkinson y Brown, 2015)

### Síntesis y Catabolismo de la Serotonina

La 5-HT se sintetiza a partir del aminoácido esencial L-triptófano, presente en alimentos de origen animal (Le Floc'h y col., 2010), el cual ingresa a la célula por el transportador grande de aminoácidos neutros (LAT) (Boado y col., 1999). En el citoplasma el L-triptófano es hidroxilado por la triptófano hidroxilasa (TPH) y el cofactor tetrahidrobiopterina (BH<sub>4</sub>) lo que da origen al 5-hidroxitriptófano (5-HTP) (Figura 2). Se describen dos isoformas de la TPH, la TPH1 en tejidos periféricos y la TPH2 en el SNC. El 5-HTP es descarboxilado por acción de la aminoácido descarboxilasa (AADC) lo que da origen a la 5-HT más bihidro-biopterina (BH<sub>2</sub>). En las neuronas la 5-HT es transportada hacia las vesículas sinápticas por el transportador de las monoaminas (MAT).

Las vesículas se fusionan con la membrana de la célula presináptica y la amina se libera al espacio sináptico donde actúa sobre sus receptores localizados en la membrana de la célula postsináptica. La 5-HT restante se une a la proteína transportadora de la 5-HT (SERT, *SLC6A4*) y se incorpora al interior de la célula presináptica donde es catabolizada por la monoaminoxidasa (MAO) y la aldehidodeshidrogenasa (ALDH) lo que da origen al ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabolito de la 5-HT (Best y col., 2010).

## Receptores a 5-HT

Con base en sus características estructurales, farmacológicas y funcionales, los receptores a 5-HT se clasifican en siete categorías con 14 subtipos. Los receptores 5-HT<sub>3</sub> son canales iónicos dependientes de ligando y se les divide en los subtipos 5-HT<sub>3 (A-C)</sub> (Chameau y van Hooft, 2006). Los otros receptores a 5-HT están acoplados a proteínas G (GPCRs).

Se describen cinco subtipos de receptores 5-HT<sub>1 (A-F)</sub> que están acoplados a GPCRs del tipo G<sub>i/o</sub> cuyo estímulo inhibe la formación del Adenosin Monofosfato Cíclico (AMPc). Mientras que para los receptores de la clase 5-HT<sub>2</sub> se describen tres subtipos 5-HT<sub>2 (A-C)</sub> que están acoplados a GPCRs del tipo G<sub>q/11</sub> y cuyo estímulo incrementa la hidrólisis de los fosfatos de inositol y elevan la concentración de calcio (Ca<sup>2+</sup>) en el citosol de la célula. Los receptores de las clases 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>6</sub> y 5-HT<sub>7</sub> están acoplados a GPCRs del tipo G<sub>s</sub> y su estimulación resulta en la formación de AMPc, mientras que los de la clase 5-HT<sub>5</sub> (subtipos 5-HT<sub>5A</sub> y 5-HT<sub>5B</sub>) se unen a GPCRs del tipo G<sub>i/o</sub> e inhiben la formación del AMPc (Barnes y Sharp, 1999; Hannon y Hoyer, 2008; Hoyer y col., 2002). En el cuadro 1 se resumen el tipo de receptor a 5-HT, sus efectos sobre segundos mensajeros y su localización en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.

## Receptor 5-HT<sub>1D</sub>

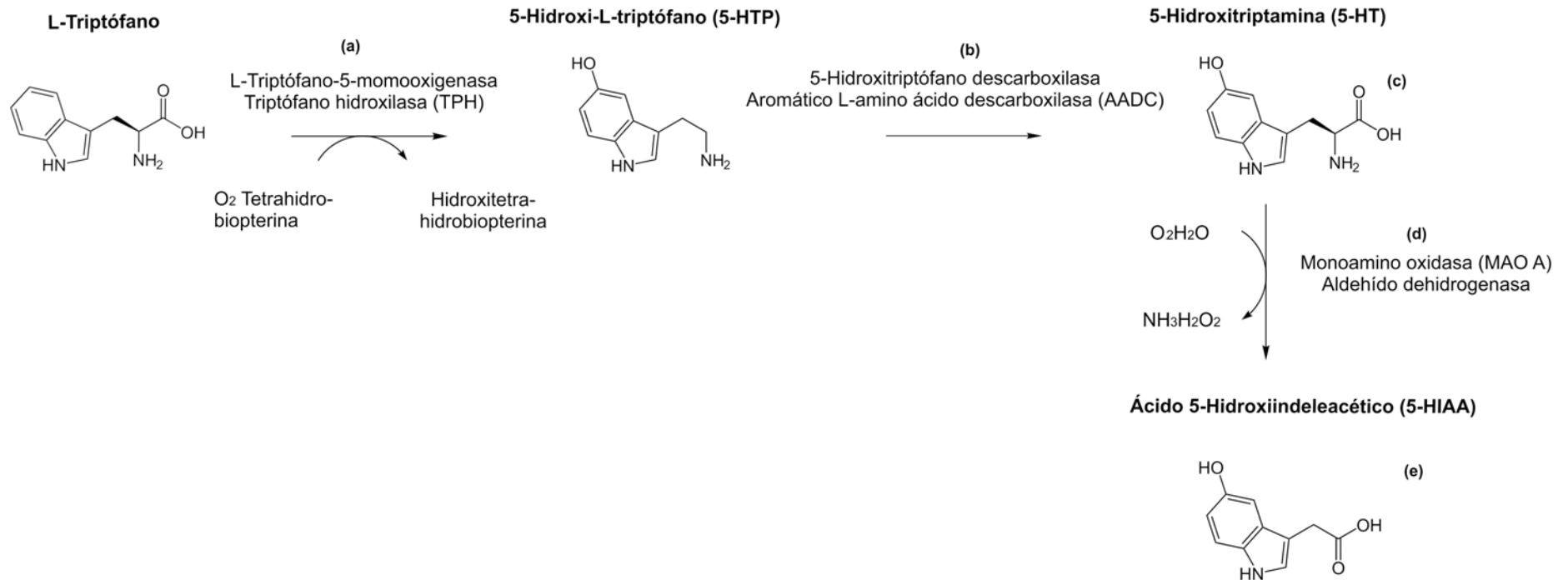
El receptor 5-HT<sub>1D</sub> está formado por 374-377 aminoácidos, en los mamíferos se expresa en menor cantidad que los demás receptores serotoninérgicos (Hannon y Hoyer, 2008) y su presencia está vinculada con etapas tempranas del desarrollo embrionario de diferentes estructuras (Bonnin y col., 2006).

En el ratón, el receptor 5-HT<sub>1D</sub> se ha identificado en los ovocitos, embriones de dos células, mórulas y blastocitos; así mismo, se observa que cuando se mantienen in vitro, y al



medio se le agrega sumatripan, antagonista del receptor 5-HT<sub>1D</sub>, disminuye el número de blastocitos e incrementa la degeneración de los embriones (Veselá y col., 2003; Il'ková y col., 2004). Con estos resultados los autores proponen que la 5-HT actúa como un regulador del desarrollo embrionario.

La excitación del receptor 5-HT<sub>1D</sub> en células musculares lisas estimula la proliferación celular. Liu (2004) describe que el bloqueo del receptor 5-HT<sub>1D</sub> resulta en la disminución de la actividad de Rho A, una GTPasa de bajo peso molecular y su proteína efectora [proteína cinasa Rho asociada (ROCK)], las cuales activan factores de transcripción [como la cinasa de regulación de señal extracelular (ERK)] que estimulan la expresión de genes que participan en la reorganización del citoesqueleto, evento esencial para la proliferación de una célula y que en el ovario humano estimulan la expresión de genes que promueven el desarrollo de las células germinales que darán origen a los ovocitos (Eddie y col., 2015).



**Figura 2. Biosíntesis y catabolismo de la 5-HT.** La 5-HT es sintetizada a partir del L-Triptófano, el cual por efecto de la triptófano hidroxilasa (TPH) **(a)** se convierte en 5-hidroxitriptófano (5HTP). El 5-HTP es descarboxilado por acción de la descarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC) **(b)** lo que da origen a la 5-hidroxitriptamina (5-HT) **(c)**, la cual por acción de la monoaminoxidasa (MAOA) **(d)** da origen al ácido 5-Hidroxiindoleacético (5-HIAA) **(e)** (Modificado de Best y col., 2010).

**Cuadro 1. Distribución de los receptores a serotonina en el eje Hipotálamo-Hipófisis-Ovario.** El estímulo de los receptores serotoninérgicos resulta en la disminución (flechas con la punta hacia abajo) o el aumento (flechas con la punta hacia arriba) en la producción de segundos mensajeros (Modificado de Carr y Lucki, 2010; Dubé y Amireault, 2007; Wada y col., 2006).

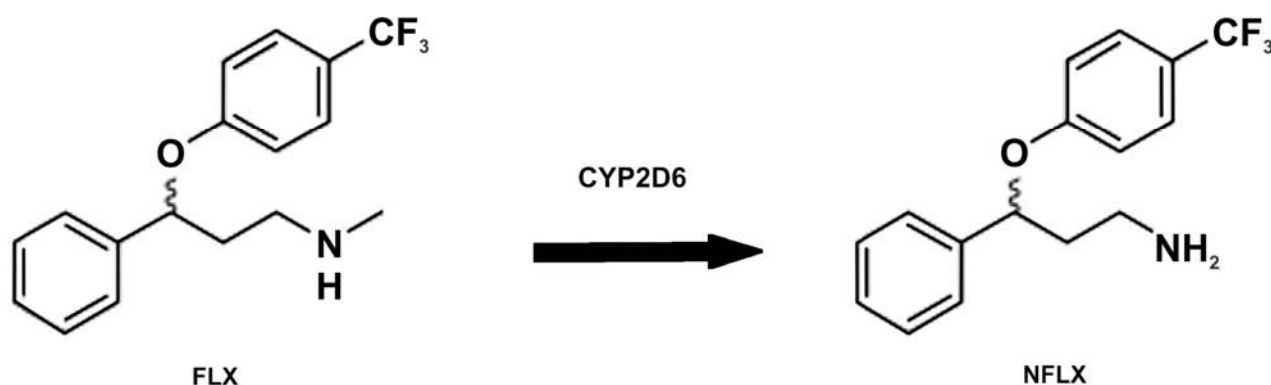
Tipo de Receptor Estimulado/Proteína G	Efecto sobre Segundos Mensajeros	Localización
5-HT <sub>1D</sub> /Gi/o	AMPC ↓	Ratón/ovocito, embriones
5-HT <sub>1A</sub> /Gi/o	AMPC ↓	Línea celular GT1-7
5-HT <sub>2A</sub> /Gq	IP <sub>3</sub> ↑	Humano/Ovocito Ratón/Células del cumulus
5-HT <sub>2B</sub> /Gq	IP <sub>3</sub> ↑	Ratón/Células del cumulus
5-HT <sub>4</sub> /Gs	AMPC ↑	Línea celular GT1-7 Rata/Agregados celulares de Adenohipófisis
5-HT <sub>5</sub> /Gi/o	AMPC ↓	Rata/Agregados celulares de Adenohipófisis
5-HT <sub>6</sub> /Gs	AMPC ↑	Línea celular GT1-7 Rata/Agregados celulares de Adenohipófisis
5-HT <sub>7</sub> /Gs	AMPC ↑	Humano/Células de la granulosa Ratón/Células del cumulus, ovocitos, embriones

## **Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina (ISRS)**

Los ISRS inactivan a la SERT, una proteína de 12 dominios transmembranales (miembro de la familia de transportadores acarreadores de solutos de neurotransmisores 6 (SLC6), cuya actividad que depende de una bomba de  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$  (Descarries y Riad, 2012). El mecanismo de acción de los ISRS se clasifica en: la acción directa o farmacológica, e indirecta o moduladora. La primera ocurre después de la administración aguda y resulta en el incremento en la concentración de 5-HT en el espacio extracelular. La indirecta sucede con la administración crónica y tiene efectos sobre la expresión del ARNm o la producción de la proteína SERT. (Blier y col. 1998).

Los trastornos del estado del ánimo son padecimientos que se asocian con la disminución en la concentración de las monoaminas en el SNC (Sümegi, 2009). La 5-HT es una de las aminas involucradas en la etiología de diferentes padecimientos emocionales y es por lo anterior que fue a partir de la segunda mitad del siglo XX que se desarrollaron medicamentos para disminuir el catabolismo de la 5-HT en las hendiduras sinápticas.

La FLX es uno de los fármacos que pertenecen a la familia de los ISRS. La FLX es metabolizada en el hígado principalmente por la enzima citocromo P450 2D6 (CYP2D6) cuya acción da origen a la norfluoxetina (NFLX) (Figura 3-A y 3-B) un metabolito biológicamente activo que ejerce un papel similar en la inhibición de la recaptura de 5-HT y prolonga su eficacia (Mandrioli y col., 2006). La FLX inhibe a las enzimas que la metabolizan, lo cual induce la saturación del fármaco en el organismo. En el ser humano la FLX tiene una vida media de entre 1-4 días, mientras que la de la NFLX es de 7-14 días, que en comparación con otros miembros de la familia de los ISRS es una vida media larga (Vaswani y col. 2003). En el caso de la rata, la inyección subcutánea de 3 mg/kg de FLX, la vida media es de 2.08 h (Qu y col., 2009), sin embargo, se ha mostrado que la biodisponibilidad del fármaco incrementa con la dosis, ya que la FLX exhibe una cinética no lineal que se refleja en el incremento desproporcionado del mismo fármaco en sangre después del aumento en la dosis (Hiemke y Härtter, 2000).



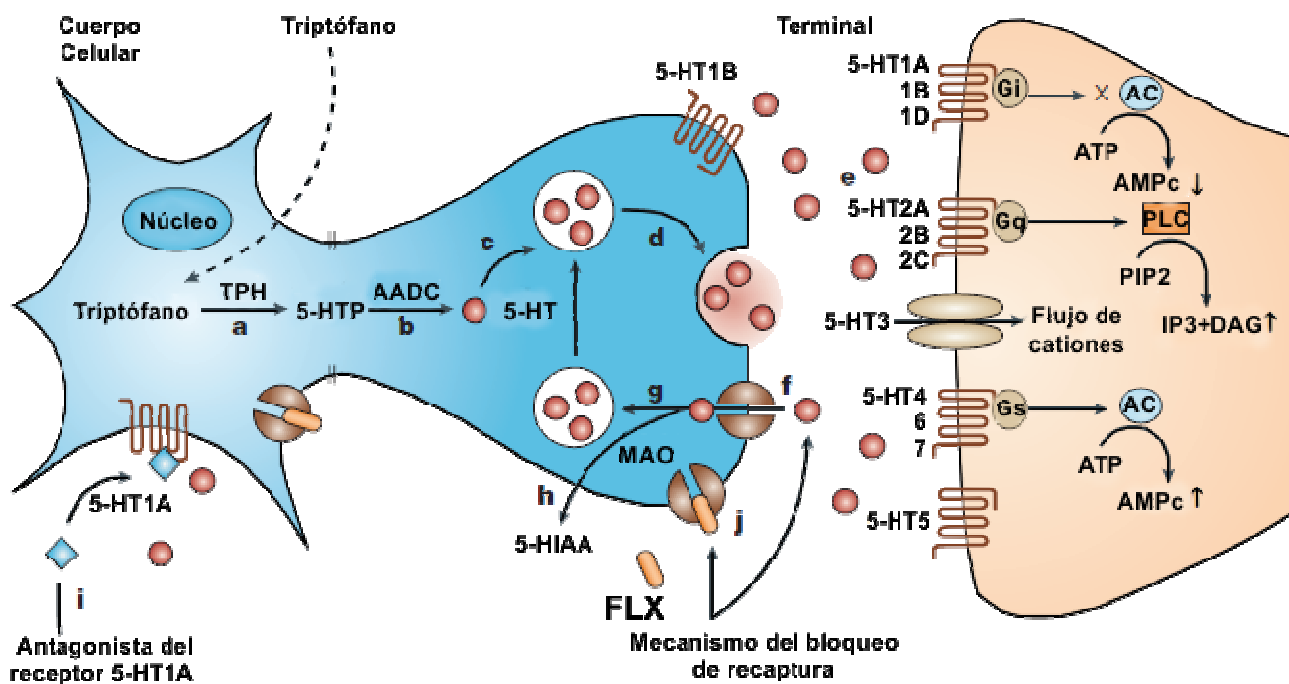
**Figura 3-A. Estructura Química de la fluoxetina (FLX) y norfluoxetina (NFLX).** La principal enzima que metaboliza a la FLX en NFLX es la Citocromo P450, familia 2, subfamilia D, polipéptido 6 (CYP2D6) -principal enzima que metaboliza a la FLX en NFLX-

Además de inhibir la recaptura de 5-HT la FLX también actúa sobre otros componentes del sistema serotoninérgico. Disminuye la expresión de la TPH en el NDR (MacGillivray y col., 2010) que dentro de los núcleos del raqué es el que tiene un mayor número de neuronas serotoninérgicas (Harsing, 2006); Así mismo Inhibe de forma no competitiva a la MAO-A la cual es la responsable de la degradación de la 5-HT (Fišar y col., 2010). Además es un antagonista de los receptores a serotonina del tipo 5-HT<sub>2</sub> (Sánchez y Hyttel, 1999) cuyo estímulo es esencial en la síntesis de hormonas esteroides por el ovario (Tanaka y col., 1993; Romero, 2009).

Hodes y colaboradores (2010) mostraron que la farmacocinética de la FLX depende del sexo del animal. El ratón hembra cataboliza de forma más eficiente el fármaco que los machos, ya que la inyección de bajas dosis de FLX en las hembras se traduce en una mayor producción de NFLX. Los autores atribuyen estos efectos a que en las hembras existe una mayor actividad de enzimas citocromo P450 que degradan la FLX. Cuando a los monos rhesus se les administra FLX vía oral, la concentración de 5-HT y de 5-HIAA en el líquido cerebrospinal fue mayor en las hembras que en los machos (Golub y Hogrefe, 2014). Estos efectos posiblemente son el resultado de que además de que en las hembras existe una mayor actividad de las enzimas que degradan a la FLX, también respondan mejor a los efectos de la inhibición de la recaptura de 5-HT.

A la FLX se le considera un disruptor de la ciclicidad normal, ya que la inyección intraperitoneal de 10 mg/kg del fármaco en la rata cíclica (ratas que presentan dos ciclos vaginales de cuatro días consecutivos cada uno) resulta en el alargamiento de las etapas del ciclo estral principalmente el proestro y estro (Uphouse y col., 2006). En contraste, otros autores muestran que la inyección de la misma dosis de FLX no modifica la duración o las características de las etapas del ciclo estral (Matuszczyk y col, 1998).

Moore y Colaboradores (2015) mostraron que la inyección intraperitoneal de FLX a ratas preñadas aumenta el número de folículos, la presencia de células apoptóticas, el ARNm para la TPH2 y para los receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$  en el ovario de las crías; por lo que los autores concluyen que la administración perinatal de FLX altera la dinámica folicular además de la expresión de genes que regulan la señalización serotoninérgica.



**Figura 3-B. Esquema de la transmisión serotoninérgica.** a Triptófano hidroxilasa (TPH), 5-Hidroxitriptófano (5-HTP), b Desacarboxilasa de aminoácidos aromáticos (AADC), c 5-Hidroxitriptamina (5-HT), d la 5-HT es transportada en vesículas y es liberada en el espacio sináptico, e la 5-HT activa receptores con diferentes subtipos, la unión del neurotransmisor desencadena distintas cascadas de señalización en la neurona postsináptica, f la 5-HT es recapturada mediante el transportador de la 5-HT en la neurona presináptica, g, h dentro de la terminal sináptica la 5-HT puede ser almacenada en vesículas para ser degradada por la monoaminoxidasa (MAO) en el ácido 5-Hidroxiindoleacético (5-HIAA), i la 5-HT activa autoreceptores somatodentríticos 5-HT1A los cuales pueden ser bloqueados por antagonistas, j la fluoxetina (FLX) bloquea la actividad del transportador a 5-HT. Adenilatociclasa (AC); diacilglicerol (DAG); Trifosfato de inositol (IP<sub>3</sub>); Bifosfato fosfatidilinositol (PIP<sub>2</sub>). (Modificado de Wong y col., 2005).

## Pubertad

La pubertad es el periodo comprendido entre la inmadurez y la madurez sexual. Durante esta etapa ocurren una serie de cambios fisiológicos y morfológicos que culminan con el inicio de la capacidad reproductiva (Plant, 2015).

En la rata hembra el único signo externo de que ha iniciado la pubertad es la canalización de la vagina como resultado del aumento de la concentración de  $E_2$ . Las fases de la pubertad se clasifican con base en parámetros fisiológicos, como cambios en la concentración de gonadotropinas circulantes y modificaciones en el mecanismo de retroalimentación ejercido por los esteroides en el eje hipotálamo-hipófisis (Ojeda y Skinner, 2006).

Según Ojeda y Skinner (2006). El desarrollo prepuberal en la rata se divide en cuatro etapas: Neonatal, infantil, juvenil y peripuberal (Figura 4).

- ∞ **Etapa neonatal (nacimiento al día 7 de vida).** Durante este periodo se inician los cambios que permiten el establecimiento de la interrelación entre los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en etapas posteriores. Existen altas concentraciones de FSH y LH en suero como resultado de la inefectividad del  $E_2$  de generar mecanismo de retroalimentación inhibitorio. Las concentraciones bajas de  $E_2$  son el resultado de la insuficiente actividad de la aromatasa y de la alta concentración de alfa fetoproteína (AFP) la cual se une al  $E_2$  e impide su actividad (Picut y col., 2014). En el ovario se detecta ARNm inmaduro para el receptor a FSH (FSHR) desde el día 1 y para el receptor a LH (LHR) a partir del día 7 de vida (Sokka y col., 1992). Los receptores funcionales a FSH se expresan entre el día 3 y 5 de vida, cuando se forman los folículos primarios. El desarrollo folicular y la esteroidogénesis es estimulada por moléculas producidas por la inervación extrínseca que recibe el ovario, como el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y las catecolaminas mediante su unión a receptores  $\beta_2$ -adrenergicos (Findlay y Drummond, 1999).
- ∞ **Etapa infantil (día 8 al día 21).** El sistema de neuronas que secretan a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (GnRHérgicas) genera aumentos bruscos espontáneos en la concentración de GnRH denominados “picos de secreción”. Se incrementa la respuesta de la adenohipófisis a la GnRH y como resultado se presenta un pico de secreción de FSH al día 12, también se presentan picos esporádicos en la

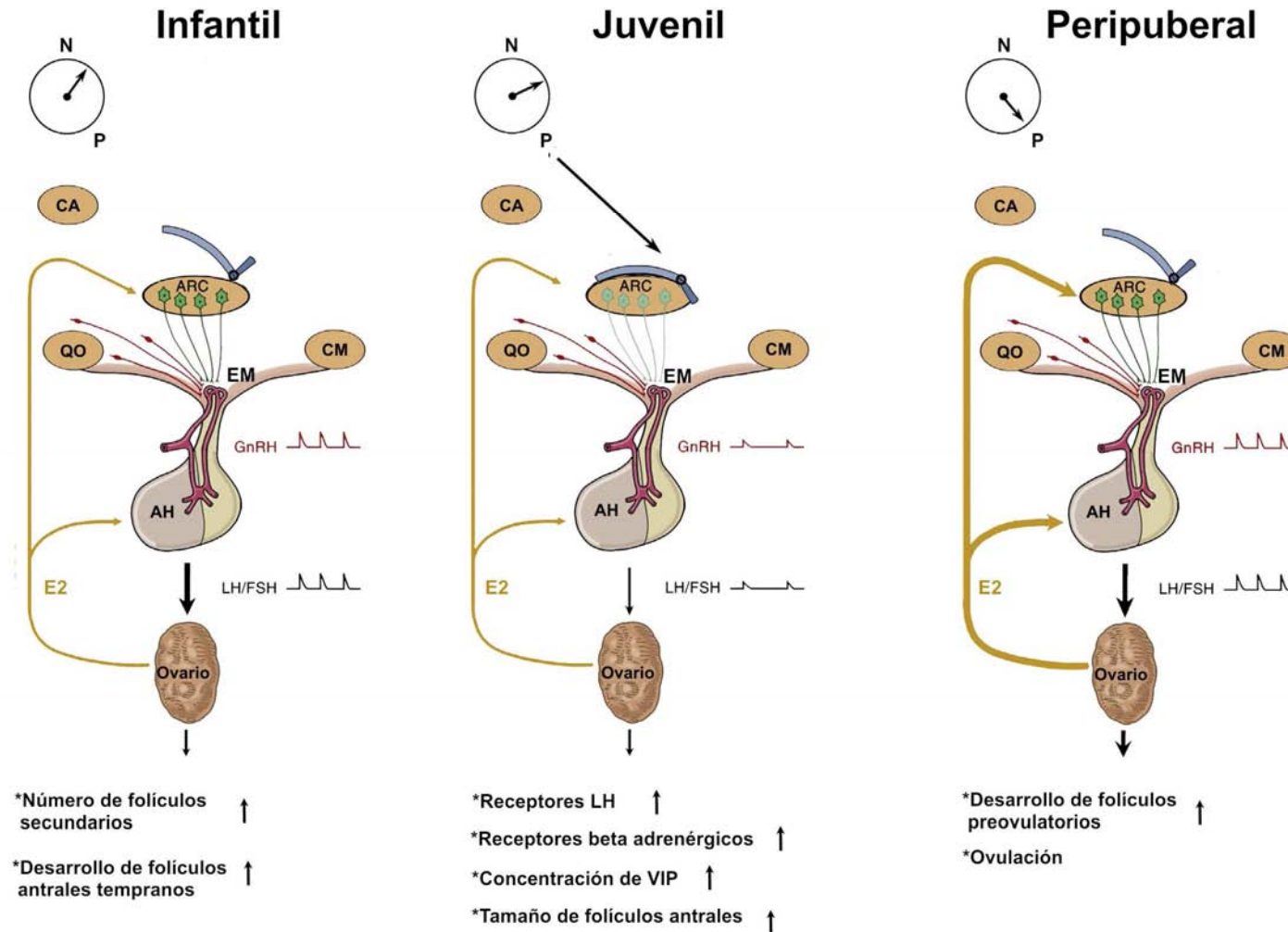
secreción de LH. En esta etapa el principal factor que contribuye a una elevada concentración de FSH es la ineffectividad del  $E_2$  de inducir el mecanismo de retroalimentación inhibitorio de la secreción de FSH. Al final de este periodo la concentración plasmática de FSH disminuye y desaparecen los picos esporádicos de LH. En el ovario aparecen los receptores a LH al día 10 de vida, se incrementa el número de folículos secundarios y se desarrollan los folículos antrales tempranos (Picut y col., 2014).

- ∞ **Etapa juvenil (inicia en el día 22 y finaliza entre los días 30-32).** Una de las primeras manifestaciones hormonales de que se ha iniciado la pubertad es la modificación diurna de la secreción de la LH lo que ocurre al final de la etapa juvenil. Las características del patrón de secreción de la LH en las ratas prepúberes inicia alrededor del día 30, e incluyen el incremento de la amplitud de los pulsos de la LH, lo que se traduce en la mayor producción de progesterona ( $P_4$ ) y  $E_2$ . La concentración plasmática de LH es similar durante la mañana y la tarde, mientras que la de FSH continúa disminuyendo. En el ovario se incrementa el número de receptores a LH, disminuyen los de FSH, aumenta el tamaño los folículos antrales y se presentan oleadas de atresia (Picut y col., 2014).
  
- ∞ **Etapa peripuberal (tiene una duración variable y finaliza con la primera ovulación).** Esta etapa se caracteriza por la mayor respuesta del ovario a las gonadotropinas. Durante este periodo el aumento en la concentración basal de LH así como la amplitud de los pulsos de secreción durante la tarde estimulan en el ovario mayor producción de  $E_2$ , que es necesario para activar el mecanismo de retroalimentación estimulante del eje hipotálamo-hipófisis-ovario que culmina con la posterior canalización de la vagina y la ovulación. En el ovario incrementa el desarrollo de los folículos preovulatorios (Picut y col., 2014).

Con base en criterios morfológicos el estudio de la cascada de eventos que culminan con el inicio de la pubertad en la rata se han clasificado en cinco etapas (Ojeda y Skinner, 2006).



- ∞ Anestro. Corresponde al momento en el cual se establece el patrón de secreción de LH, que ocurre alrededor de los 30 días de edad, en esta etapa el útero es pequeño y no contiene fluido. La vagina se encuentra cerrada.
- ∞ Proestro temprano. El útero contiene abundante fluido y la vagina permanece cerrada.
- ∞ Proestro tardío. Corresponde al primer proestro. Los animales tienen el útero “balonado”, es decir, el útero está lleno de fluido. En el ovario se observa una gran cantidad de folículos preovulatorios y la mayoría de los animales presentan la vagina cerrada.
- ∞ Estro. En este momento se produce la primera ovulación, el útero no presenta fluido, el ovario muestra cuerpos lúteos frescos, la vagina está abierta y su citología está compuesta principalmente por células cornificadas que se forman como resultado del aumento previo de E<sub>2</sub> (Goldman y col., 2007).
- ∞ Diestro 1. Esta etapa se caracteriza por que la citología de la vagina está formada en su mayoría por leucocitos y el ovario presenta cuerpos lúteos maduros.



**Figura 4. Modelo donde se representan los principales cambios que ocurren durante las etapas infantil, juvenil y peripuberal y que culminan con el inicio de la pubertad y la ovulación.** Durante la etapa infantil las neuronas GnRHérgicas generan episodios de secreción de GnRH espontáneos, aparecen aumentos esporádicos de la secreción de LH, se presenta un aumento brusco en la secreción de FSH, la concentración basal de ésta hormona es alta y comienza a disminuir al final de esta etapa. En la etapa juvenil el patrón de secreción de LH por las mañanas y tardes es resultado de patrones de secreción similares de GnRH, la concentración de FSH continúa disminuyendo. En el periodo peripuberal aumenta la amplitud de los pulsos de secreción de LH y la concentración de FSH es mínima, Las líneas doradas indican el mecanismo de retroalimentación inhibitorio ejercido por el E<sub>2</sub> producido por el ovario, el grosor muestra el grado de inhibición de la secreción de LH ejercido por el E<sub>2</sub>. N (nacimiento), P (pubertad), CA (Comisura anterior), ARC (Núcleo arcuato), QO (Quiasma óptico), EM (Eminencia media), CM (Cuerpo mamilar), AH (Adenohipófisis) (Modificado de Plant, 2015).

## Desarrollo Folicular

En el ovario se distingue una región interna o médula que está formada por tejido conjuntivo laxo que contiene vasos sanguíneos, linfáticos además de fibras nerviosas que ingresan y salen por el hilio y la región externa o corteza, constituida por tejido conectivo, donde se encuentran los folículos en diferentes etapas de diferenciación (primordiales, primarios, secundarios o antrales y preovulatorios o de De Graaf) (Magoffin, 2005) (Figura 4).

El folículo ovárico es una unidad multicelular constituida por células de la teca interna, por células de la granulosa y un ovocito que crece y se diferencia dentro del folículo (Li y Albertini, 2013; Epifanio y Dean, 2002). Las células de la teca interna y las de la granulosa están separadas por una membrana basal. Los *folículos primordiales* están formados por el ovocito (detenido en la profase de la primera división meiótica) que es rodeado por una capa de células epiteliales de forma aplanada denominadas células pre-granulosas, separadas del estroma ovárico por la lámina basal folicular (Nguyen y col., 2012; Rajkovic y col, 2006). Durante la transición del folículo primordial a *folículo primario*, el ovocito aumenta de tamaño y las células pre-granulosas crecen, y adquieren una forma cúbica y posteriormente cilíndrica, a estas células se les denomina células de la granulosa. La señalización paracrina bidireccional entre las células de la granulosa y el ovocito se forma por las proyecciones transzonales (TZPs) que son proyecciones de la superficie de las células de la granulosa que al hacer contacto con la membrana plasmática del ovocito forman uniones gap y uniones adherentes. Estas uniones proveen la base estructural de la comunicación intercelular en etapas avanzadas del desarrollo folicular (Li y Albertini, 2013).

El *folículo secundario* se caracteriza por la estratificación de las células de la granulosa, que es estimulada por la FSH y por factores que secreta el ovocito como son el factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9) y la proteína morfogénica del hueso 15 (BPM-15) (Palermo, 2007). Cuando el número de capas de células se incrementa, dentro del folículo se forma una cavidad llena de fluido que constituye el antro folicular (Nguyen y col., 2012). Durante ésta etapa la diferenciación de las células de la granulosa es estimulada por los estrógenos y la FSH (Couse y col., 2006). Conforme el folículo se desarrolla, el ovocito adquiere una posición excéntrica y las células de la granulosa que lo rodean forman al *cumulus ooforus*. En el *folículo antral temprano* se diferencian las células de la teca a partir de células mesénquimales del estroma y se forman las células de la teca interna donde se

sintetizan los andrógenos y teca externa que está vascularizada y no posee la capacidad de llevar a cabo la esteroidogénesis *de novo* (Rajkovic y col, 2006).

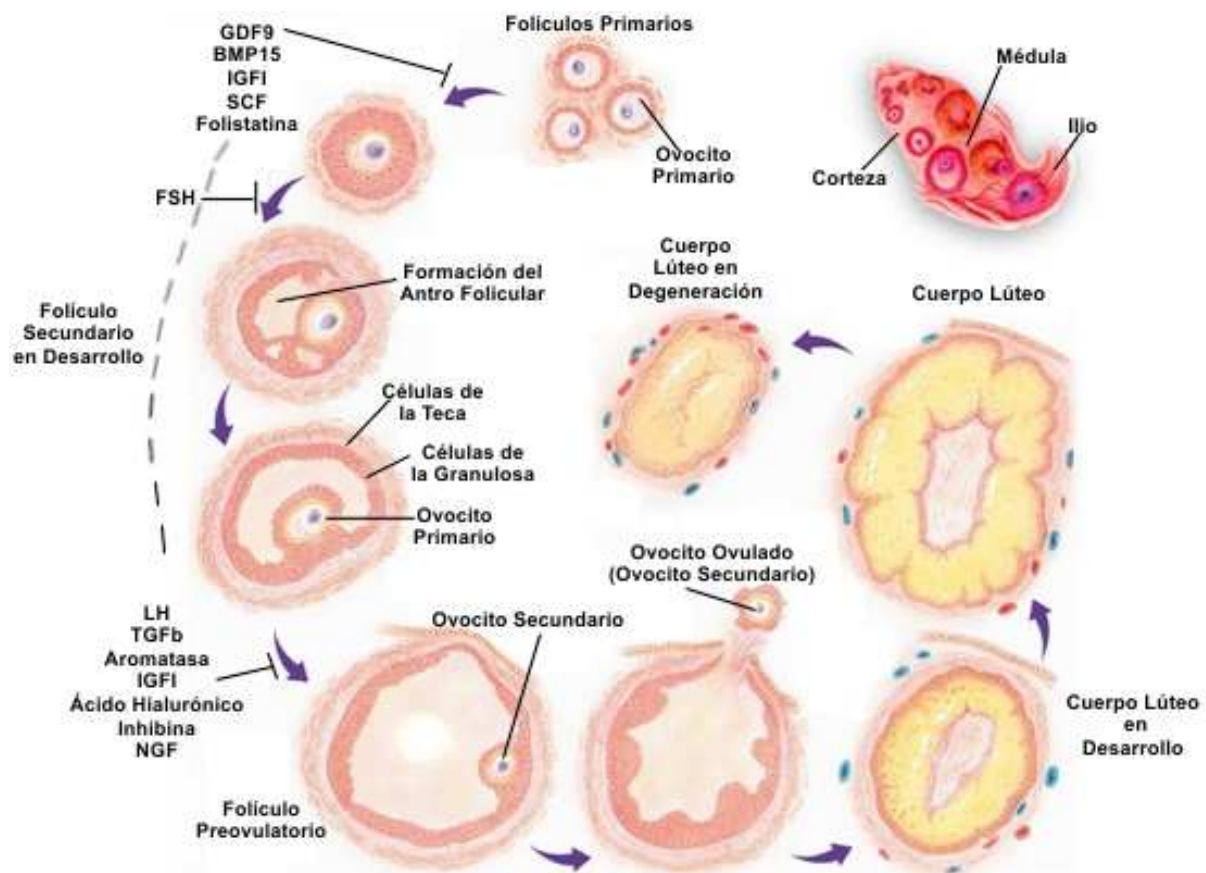
Las células de la granulosa se clasifican en tres grupos, murales, antrales y del complejo del cúmulus. Las células de la granulosa murales y antrales están separadas de la teca por la membrana basal (Rajkovic y col, 2006). Las células murales de los folículos antrales tienen una mayor actividad esteroidogénica ya que expresan en mayor proporción de citocromo P450 aromatasa (P450arom, CYP19A1) que es esencial en la transformación de los andrógenos a estrógenos como el E<sub>2</sub>. El E<sub>2</sub> estimula el crecimiento de las células de la granulosa, la síntesis del factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I), mantiene los receptores a FSH, induce la expresión de los receptores a LH, estimula la expresión de la P450 aromatasa y disminuye la apoptosis en las células de la granulosa. También sintetizan el ácido hialurónico (Nguyen y col., 2012; Rajkovic y col, 2006).

Algunos factores de crecimiento y diferenciación que producen el ovocito y las células de la granulosa de los folículos en desarrollo estimulan la diferenciación de las células de la teca como: el IGF-I o II, el GDF-9, el de células troncales (SCF) y la folistatina (Magoffin, 2005). En las células de la teca interna se expresan los receptores a LH, la expresión de estos receptores es inducida por factores como: el IGF-I, la inhibina, el factor de crecimiento nervioso (NGF) y el GDF-9. El estímulo de los receptores a LH promueve en la teca la secreción de los andrógenos. Además de la LH, la síntesis de andrógenos es regulada por el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) y la activina que son producidas por las células de la granulosa (Magoffin, 2005).

El *folículo preovulatorio o de De Graaf* está formado por el ovocito rodeado por la zona pelúcida constituida por glicoproteínas. Los vasos sanguíneos y linfáticos irrigan a la teca y no llegan a la capa granulosa (Figura 5). Antes de la ovulación el folículo incrementa su tamaño y se desprenden las células de la sección basal del *cumulus ooforus*, lo que permite que el ovocito flote en el líquido folicular rodeado por células de la granulosa orientadas radialmente por lo que reciben el nombre de corona radiada (Eppig y col., 1996). Una vez que el ovocito es liberado las células de la teca y granulosa inician su diferenciación hacia células luteinizadas como resultado del estímulo de la LH (Palermo, 2007).

La ovulación es uno de los procesos con el que culmina el desarrollo y la maduración folicular e implica la liberación de un ovocito capaz de ser fecundado. En el ovario se producen un conjunto de cambios bioquímicos y morfológicos que son modulados por las hormonas secretadas por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Espey y Richards, 2006).

El otro proceso con el que finaliza el desarrollo folicular es la atresia (Fink, 1988).



**Figura 4. Esquema del desarrollo folicular.** Antes de la formación del antro el crecimiento es independiente del estímulo gonadotrópico, en el esquema se enlistan una serie de factores que son producidos por el ovocito, las células del folículo o ambas, que participan en este proceso. Factor de crecimiento y diferenciación 9 (GDF9), proteína morfogenética del hueso 15 (BMP15), factor de crecimiento parecido a la insulina-I (IGF-I), factor de las células troncales (SFC), factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), factor de crecimiento nervioso (NGF) (Modificado de Rajkovic y col., 2006 en Knobil and Neill's Physiology of Reproduction)

El inicio de la ovulación involucra la transformación de los diferentes tipos celulares que constituyen al folículo: el ovocito, las células de la granulosa y teca, del estroma (fibroblastos y células endoteliales) y de la superficie del epitelio ovárico. Se inicia la desintegración y ruptura de la sección apical del folículo preovulatorio, lo que permitirá liberar al ovocito, a esta área se le denomina estigma (Robkera y col., 2000). Previo a la ovulación el ovocito se divide y expulsa el primer cuerpo polar, con lo cual reduce el número de cromosomas, momento en el cual tiene la misma cantidad de ADN que una célula somática. Las células del

epitelio superficial presentan necrosis y acumulación de vacuolas en el citoplasma (Espey y Richards, 2006). En la túnica albugínea y la teca externa los fibroblastos se alargan hasta disociarse. Los vasos sanguíneos que irrigan a las células de la teca interna se dilatan, se rompen y vierten glóbulos rojos localmente lo cual estimula el aumento de líquido en el antro folicular y como resultado incrementa la presión antral (Robkera y col., 2000). En esta zona las células de la granulosa presentan la formación de gotas de lípidos en el citoplasma, posteriormente estas células se desprenden hacia el antro folicular, mientras que las células de la granulosa del complejo cumulus se expanden (Espey y Richards, 2006)

El pico preovulatorio de LH induce la expresión de algunos genes que codifican para proteínas que son necesarias para que se lleve a cabo la ovulación. Los fibroblastos en el folículo generan de plasminógeno activador (PA), el cual contribuye a catalizar la activación de la proteólisis del tejido conectivo de la pared del folículo. En las células de la teca y granulosa incrementa la producción de  $P_4$  y la expresión de sus receptores (PR). Aumenta la expresión de la desintegrina y metaloproteinasa con motivos de trombospondina (ADAMTS-1) que estimula la angiogénesis. En las células de la granulosa aumenta la expresión de las ciclooxigenasas (COX), enzimas que biotransforman al ácido araquidónico en prostaglandinas, moléculas que están relacionadas con el proceso inflamatorio (Espey y Richards, 2006). En conjunto estos cambios culminan con la remodelación de la pared folicular y la liberación del ovocito.

La mayoría de los folículos que inician su desarrollo no lo completan y degeneran, proceso que se denomina, atresia folicular, y que es inducido principalmente por la muerte (apoptosis) de las células de la granulosa (Manabe y col, 2004). La apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos, bioquímicos y moleculares que conducen a la degeneración del folículo (Hubbard y Oxberry, 1991). La apoptosis es la muerte celular programada que en las células de los mamíferos se lleva a cabo mediante dos vías, la extrínseca mediada por receptores de muerte y la intrínseca conocida como vía mitocondrial. Ambas vías se dan en respuesta a estresores como fármacos citotóxicos o daño al ADN (Hutt, 2015).

Entre los cambios morfológicos se encuentra el aumento de picnosis de las células de la granulosa, la degeneración de la membrana basal e hipertrofia de las células de la teca. Además, como resultado de la pérdida de comunicación entre las células de la granulosa y el ovocito se producen alteraciones en el mismo (Hubbard y Oxberry, 1991; Tiwari y col., 2015).

Los cambios bioquímicos incluyen: disminución en la concentración de las gonadotropinas y sus receptores, de la actividad de la enzima  $17\alpha$ -hidroxilasa y aromatasa, lo que disminuye

la concentración de estrógenos y favorece la acumulación de andrógenos (Hsueh y col., 1994; Kaipia y Hsueh, 1997). La atresia folicular está asociada con la disminución en la concentración de FSH. En células de la granulosa bovinas en cultivo la adición de FSH al medio inhibe la fragmentación del ADN, característica de la apoptosis (Yang y Rajamahendran, 2000). En los ovarios de ratones mutantes en cultivo a los que se les incrementó la sensibilidad a la FSH, se observó mayor número de folículos pequeños y preantrales, además de que se redujo la apoptosis (Grasa y col., 2015). En el ovocito disminuye la concentración de AMPc, de guanosin monofosfato cíclico (GMPc), óxido nítrico (ON) y se incrementa la concentración de calcio ( $Ca^{2+}$ ). Estos eventos conducen a la generación de especies reactivas a oxígeno (ROS) y la apoptosis del ovocito (Tiwari y col., 2015). En ovocitos de rata en cultivo el incremento en la concentración de  $Ca^{2+}$  induce la fragmentación y generación de gránulos en el citoplasma (Tripathi y Chaube, 2012).

Entre los cambios moleculares que se producen durante la apoptosis se encuentra la expresión de genes que codifican para proteínas que actúan como puntos de control entre la superficie de la célula y las señales internas de muerte.

En la vía extrínseca, los receptores de muerte se activan mediante ligandos como el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ) el cual se ha identificado en los ovocitos, células de la granulosa y teca donde ejerce efectos tanto inhibitorios como estimulantes sobre la muerte de la célula que dependen del tipo de receptor al cual se une (Husseini, 2005; Manabe y col., 2004), o el ligando Fas, cuya expresión se incrementa en el ovario de cerdo durante la atresia (Lin y col., 2014).

La vía intrínseca o regulada por las proteínas Bcl-2, que incluye miembros pro y anti-apoptóticos como Bax y Bcl-2 Gallegos (2007) mostró que en el ovario de la rata prepúber el aumento en la expresión de Bax inducido por la administración de S5-HT estimula la muerte de los folículos. Mientras que en las células de la granulosa de rata en cultivo el estímulo de la expresión de Bcl-2 promueve la expresión de prohibitina, una proteína que bloquea la liberación de citocromo c de la mitocondria hacia el citoplasma. El citocromo c funciona como un cofactor que induce la formación de proteínas que fragmentan el ADN (Hutt, 2015). Ambas vías convergen en la activación de caspasas (proteasas cisteína aspartato) donde la cisteína catalítica, escinde a sus proteínas blanco en un aspartato (Hutt, 2015).

En los mamíferos, con base en su función las caspasas se clasifican en apoptóticas (2, 3, 7, 8, 9 y 10) e involucradas en la inflamación (1, 4, 5 11 y 12). A su vez con base en la presencia o ausencia de dominios proteicos de interacción específicos localizados hacia el

extremo N-terminal, las caspasas apoptóticas se subdividen en iniciadoras (2,8, 9 y 10) y efectoras o ejecutoras (3, 6 y 7) (Shalini y col., 2015) que son las que promueven la destrucción final de la célula (Hutt, 2015).

## **Esteroidogénesis**

En el folículo ovárico se sintetizan las hormonas esteroides. En las células de la teca se producen  $P_4$  y andrógenos como testosterona (T). La T sale a circulación o pasa a las células de la granulosa, donde es aromatizada a  $E_2$  (Gore-Langton y Armstrong, 1988) por acción de la enzima aromatasa (Stocco, 2008).

El sustrato para la síntesis de las hormonas esteroides es el colesterol que se sintetiza en la misma célula a partir del Acetil-CoA. Otra fuente son las lipoproteínas de alta densidad (HDL) que se encuentran en sangre y que mediante un proceso de endocitosis se incorporan al citoplasma de la célula o bien se utiliza el colesterol almacenado como ésteres (Miller y Bose, 2011). El colesterol es transportado al interior de la mitocondria por la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR) (Magoffin, 2005).

En las células de la teca interna, la LH se une a sus receptores acoplados a proteínas G y activa la adenilato ciclasa, que estimula la transformación del trifosfato de adenosin (ATP) en AMPc. Este actúa como segundo mensajero y estimula una cascada de señalización que culmina con la activación de genes que codifican para diferentes complejos enzimáticos entre ellos, la enzima de escisión de la cadena lateral del colesterol (P450<sub>scc</sub>) que es la responsable de transformar el colesterol en pregnenolona en la mitocondria, posteriormente la pregnenolona difunde fuera de la mitocondria y es transportada al retículo endoplásmico liso (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Stocco y McPhaul, 2006).

En el ovario, la pregnenolona es metabolizada en dos rutas. La  $\Delta_4$ , donde se transforma en progesterona o 17-Hidroxiprogesterona, y andrógenos como la androstenediona y T mediante la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa ( $3\beta$ -HSD). La ruta  $\Delta_5$  donde se sintetiza la 17-OH pregnenolona y los andrógenos, dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona. Los andrógenos se difunden a través de la membrana basal hacia las células de la granulosa, donde las gonadotropinas principalmente la FSH estimulan la formación de AMPc que activa a la enzima aromatasa (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Stocco y McPhaul, 2006) responsable de la transformación de los andrógenos a estrógenos. En la ruta



$\Delta 4$  se sintetiza la estrona y en la  $\Delta 5$  el  $E_2$ . Los estrógenos secretados por las células de la granulosa actúan en las mismas estimulando su proliferación o pasan a la circulación y son transportados a sus órganos blanco (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Stocco y McPhaul, 2006) (Figura 6).

### **Serotonina y su Participación en la Regulación de la Secreción de la Hormona Liberadora de las Gonadotropinas (GnRH).**

En el hipotálamo se sintetiza la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que es liberada en forma de pulsos que varían en frecuencia y amplitud durante las fases del ciclo reproductivo. Antes de la ovulación los pulsos de GnRH se presentan con mayor frecuencia y amplitud que durante la formación del cuerpo lúteo.

La GnRH es vertida al sistema porta hipofisario donde el incremento en la frecuencia de los pulsos estimula en la hipófisis a los gonadotropos que secretan la LH, mientras que los pulsos menos frecuentes estimulan la secreción de la FSH (Tsutsumi y col., 2009). En el ovario ambas hormonas estimulan la secreción de esteroides y la ovulación (Espey y Lipner, 1994).

La secreción de las hormonas producidas por el hipotálamo, la hipófisis y el ovario que regulan la ovulación es modulada por señales hormonales y por neurotransmisores, entre los que se encuentra la 5-HT, la cual tiene efectos tanto estimulantes como inhibitorios, que dependen del tipo de receptor al cual se une (Wada y cols., 2006; Quirk y Siegel, 2005; Schmidt y col., 1988).

Mediante estudios de inmunohistoquímica y autorradiografía en fetos de rata de 14 días se mostró la presencia de fibras serotoninérgicas en el hipotálamo dorsal, ventral y anterior (particularmente en el quiasma óptico), en el núcleo arcuato y en la eminencia media (Ugrumov y col., 1986). En los núcleos dorsomedial, ventromedial y arcuato del hipotálamo el número de fibras serotoninérgicas incrementa a partir del día postnatal 9. Los autores sugieren que la innervación serotoninérgica presente en los diferentes núcleos del hipotálamo durante su desarrollo está relacionada con la regulación de la secreción de la GnRH (Ugrumov y col., 1989).

En el hipotálamo de los mamíferos, las neuronas que sintetizan GnRH se localizan en diferentes núcleos (área preóptica) y regiones extrahipotálamicas (zonas adyacentes de la región rostral) (Samson y col. 1980; Silverman y col, 1987). En el área preóptica hipotalámica

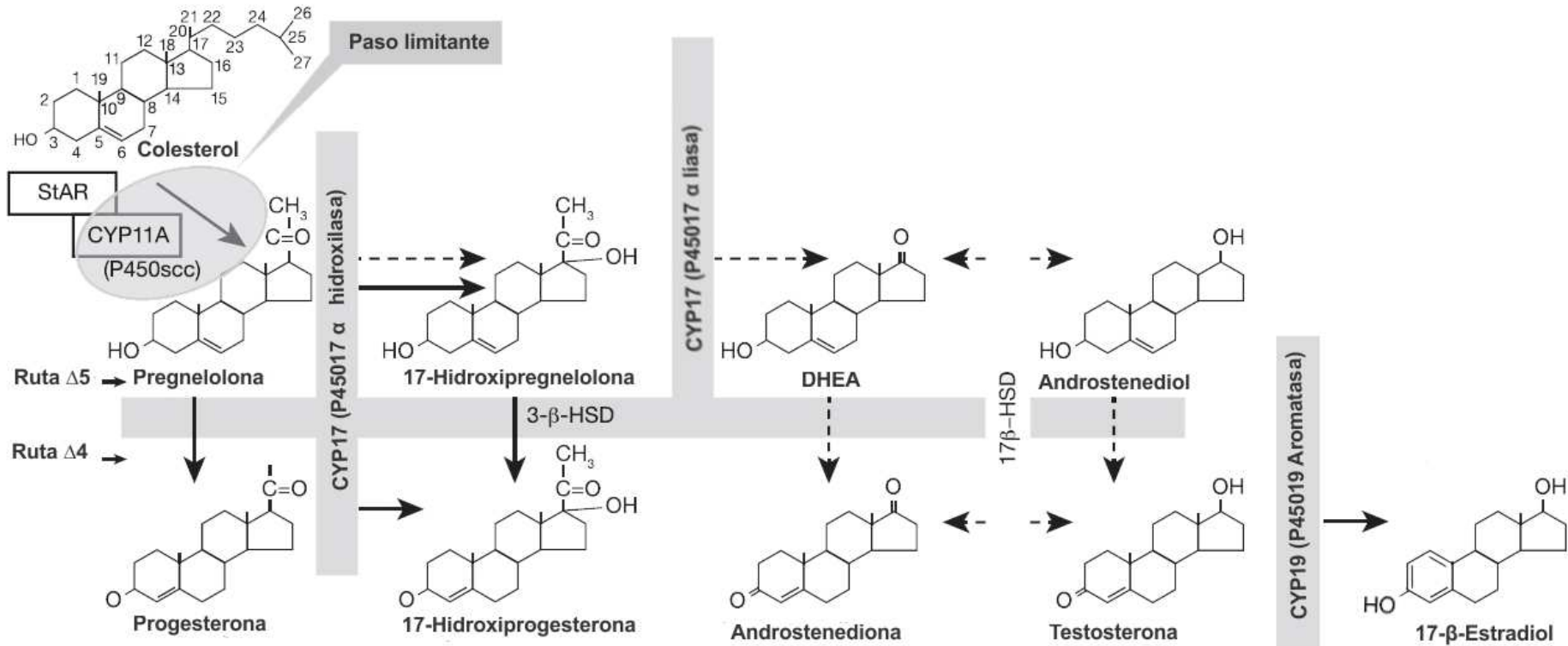
anterior las terminales nerviosas de las neuronas serotoninérgicas tienen contacto con el soma de las neuronas productoras de GnRH y se sugiere que es mediante este mecanismo que la 5-HT modula la síntesis de GnRH (Kiss y Halász, 1985; Halász y col., 1989; Tillet, 1992). Según Silverman y colaboradores (1987) del 50 al 75% de las neuronas GnRHérgicas envían sus proyecciones a la eminencia media. Estructura en donde tienen contacto sináptico con las neuronas que producen 5-HT, por lo que posiblemente la 5-HT module la liberación de la GnRH al sistema porta hipofisario.

En la rata hembra la concentración de 5-HT en el hipotálamo aumenta durante la etapa juvenil (Castro y col., 2001), lo que posiblemente esta relacionado con la maduración morfológica de las neuronas GnRHérgicas (Ojeda y Urbanski, 1988) y posteriormente con la secreción de la GnRH.

La disminución de 5-HT en la rata durante el desarrollo fetal inducida por la inyección de p-clorofenilalanina (PCPA), un inhibidor de la TPH, a hembras gestantes, resultó en el incremento del número de neuronas GnRHérgicas además de una mayor incorporación de 5-bromo-2'-deoxiuridina (BrdU) por las mismas en el cerebro de fetos en diferentes etapas de desarrollo (Pronina y col., 2010). Con base en estos resultados los autores sugieren que la 5-HT en la etapa fetal actúa como un factor morfogenético.

En la línea GT1-7, línea celular de neuronas GnRHérgicas inmortalizadas se identificaron los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>4</sub>. Cuando al medio de cultivo, en el que se mantienen estas células, se le agrega 5-HT se inhibe o estimula la generación del potencial de acción y como resultado la liberación de GnRH (Krsmanovic y cols., 2010).

Se observó que la activación de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> y 5-HT<sub>4</sub> por la adición de agonistas selectivos al medio donde se cultivan células GT1-7 estimula o inhibe diferentes cascadas de señalización. La adición al medio de la metoxifenil piperazina (2-MPP), agonista del receptor 5-HT<sub>1A</sub> acoplado a proteínas G<sub>i</sub>, resultó en la inhibición de la producción de AMPc, y la liberación pulsátil de GnRH. Este efecto se revierte si estas células también son cultivadas en presencia la toxina pertussis (PTX), la cual bloquea la actividad de las proteínas G<sub>i</sub>. En cambio, la estimulación del receptor 5-HT<sub>2C</sub>, acoplado a proteínas G<sub>q</sub>, con  $\alpha$ -metil 5-HT aumenta la concentración de IP<sub>3</sub>, incrementa la amplitud y reduce la frecuencia de los pulsos con los que se libera GnRH. Un efecto similar ocurre cuando se estimula el receptor 5-HT<sub>4</sub>, acoplado a proteínas G<sub>s</sub>, con SC 53116. Sin embargo, en este caso el incremento en la liberación de GnRH fue más evidente y de mayor duración en comparación con lo observado con el receptor 5-HT<sub>2C</sub> (Wada y cols., 2006).



**Figura 6. Esteroidogénesis Ovárica.** Enzimas que participan en la esteroidogénesis (StAR) proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda, (CYP11A) enzima de escisión de la cadena lateral de colesterol, (CYP17)17-α-hidroxilasa/17,20-liasa, (3-β-HSD) 3-β-hidroxiesteroidedeshidrogenasa, (DHEA) dehidroepiandrosterona, (17-β-HSD) 17-β-hidroxiesteroidedeshidrogenasa, (CYP19) aromatasa (Modificado de Andersen y Ezcurra 2014).

La inyección intraperitoneal de 5-HTP, precursor de la 5-HT, aumenta la concentración de 5-HT en el hipotálamo lo que estimula la secreción de GnRH, mientras que el mismo tratamiento a ratas adultas tiene el efecto contrario (Moguilevsky y Wuttke, 2001). Gouveia y Rodrigues (2004) mostraron que la microinyección de metiotepin, antagonista de los receptores 5-HT<sub>1</sub> en el área preóptica medial (APM) de ratas hembras adultas, disminuye la concentración de LH en suero pero no la de FSH, mientras que cuando se inyecta por la misma vía ketanserina, antagonista de los receptores 5-HT<sub>2</sub> disminuye la concentración de FSH pero no la de la LH. Otra de las estructuras hipotalámicas en las que la 5-HT participa en la regulación de la secreción de gonadotropinas es la zona incerta, donde la inyección de 8-OH-DPAT, agonista del receptor 5-HT<sub>7</sub>, inhibe la secreción de LH (Siddiqui y col., 2004). A partir de estos resultados los autores sugieren que la 5-HT ejerce un efecto inhibitorio o estimulante en la regulación de la secreción de gonadotropinas y que este efecto es depende del receptor al cual se une.

### **Serotonina y Regulación de la Secreción de Gonadotropinas**

A partir del día 18 del desarrollo fetal de la rata se describe la presencia de 5-HT en el lóbulo posterior de la hipófisis. Entre los días 19 y 20 el número de fibras reactivas a 5-HT se incrementa en esta zona, mientras que la aparición de fibras serotoninérgicas en el lóbulo intermedio se aprecian en la etapa postnatal. La aparición diferencial de las fibras serotoninérgicas en las etapas del desarrollo de la rata es el resultado de que la innervación proviene de diferentes zonas en el encéfalo (Szabat y col., 1998).

En los lóbulos posterior e intermedio de la hipófisis de roedores se observó la expresión de la TPH (Salad y col., 1993; Shannon y Moore, 1987<sup>a, b</sup>). Así mismo se mostró que los gonadotropos, tienen la capacidad de recapturar 5-HT (Payette y col., 1985; Johns y col., 1982). En estudios *in vitro* se ha observado que cuando las adenohipófisis de murciélago son cultivadas con 5-HT tritiada ([<sup>3</sup>H] 5-HT) los gonadotropos acumulan gránulos con [<sup>3</sup>H] 5-HT, mientras que cuando son cultivadas en presencia de la [<sup>3</sup>H] 5-HT más FLX, disminuye la acumulación de [<sup>3</sup>H] 5-HT (Nunez y col., 1981).

En el ratón los gonadotropos presentan gránulos donde coexisten LH y 5-HT o FSH y 5-HT (Payette y cols., 1987) y en agregados celulares de adenohipófisis de rata se expresa los ARNm de los receptores 5-HT<sub>4</sub>, 5-HT<sub>5</sub> y 5-HT<sub>6</sub> (Papageorgiou y Deneff, 2010). Por lo que se

propone que la 5-HT actúa en diferentes gonadotropos y como consecuencia regula de forma diferencial la secreción de las gonadotropinas vía su unión a los receptores antes mencionados.

La regulación que ejerce la 5-HT sobre la secreción de las gonadotropinas depende de la edad del animal. El estímulo del sistema serotoninérgico por la inyección intraperitoneal del precursor de este neurotransmisor, a ratas hembras prepúberes o adultas no modifica la secreción de FSH (Justo y col., 1989). En hembras de 14 días el mismo tratamiento incrementa la concentración de LH en el suero, lo que no ocurre en animales de 30 días (Arias y col., 1990). La inyección de 5-HT a la rata en la etapa del estro incrementa la concentración de LH en el suero (Becú de Villalobos y col., 1984). El bloqueo del receptor 5-HT<sub>3A</sub> en células de la línea LβT2, línea celular derivada de los gonadotropos, disminuye la secreción de LH al medio de cultivo (Quirk y Siegel, 2005). En la mujer, la administración por vía oral de ondansetron, antagonista del receptor 5-HT<sub>3</sub>, disminuye la concentración de FSH en el suero, pero no la de LH (Ulrich y col., 1994). Los resultados diferenciales antes mencionados están relacionados con diferentes mecanismos de regulación que ejerce el sistema serotoninérgico sobre la secreción de gonadotropinas durante el desarrollo del animal.

## Serotonina y Funciones del Ovario

Algunos autores postulan que la 5-HT actúa directamente en el ovario en la regulación y el mantenimiento de sus funciones

En el ovario, fluido folicular, oviducto y útero se ha mostrado la presencia de la 5-HT (Jaurio y col., 1989; Amenta y col., 1992; Bodis y col., 1992). Hasta el momento no se ha caracterizado la innervación serotoninérgica en estas estructuras. Según Amenta y col., (1992) la mayor fuente de este neurotransmisor son las plaquetas y los mastocitos, sin embargo, también se sintetiza en el ovario de diferentes especies (Zatylny y col., 2000; Dubé y Amireault 2007), especialmente en las células de complejo *cumulus* (Amireault y Dubé, 2005<sup>a</sup>).

En el ovario de los mamíferos mediante estudios de inmunocitoquímica y biología molecular (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT PCR) se ha mostrado la expresión de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>7</sub> que se localizan en las células del complejo cumulus y los del tipo 5-HT<sub>1D</sub> y 5-HT<sub>7</sub> en el ovocito (Dubé y Amireault, 2007;

Amireault y Dubé 2005<sup>b</sup>; Vésela y col., 2003). En la mujer se han identificado los receptores del tipo 5-HT<sub>2</sub> en el ovocito (Neilson y col., 2000) y el 5-HT<sub>7</sub> en las células de la granulosa (Graveleau y col., 2000).

Además, se postula que la 5-HT participa en la regulación de la ovulación y la síntesis de hormonas esteroides (Batista y col., 1987). Ya que en el ovario de la rata, la concentración de 5-HT varía durante el ciclo estral y es mayor durante el estro (Clausell y Soliman, 1978). En ovarios de rata *in vitro* el agregado de 5-HT al medio induce la ovulación (Schmidt y col., 1988), al estimular la contracción del músculo liso que rodea a los folículos preovulatorios (Talbot y Schroeder, 1982). Mientras que, la administración subcutánea de 5-HT a ratas adultas en la tarde del diestro o proestro inhibe la ovulación, efecto que es revertido por la inyección previa de progesterona o benzoato de estradiol. Los autores proponen que la 5-HT inyectada por vía sistémica no actúa en el SNC, sino que la inhibición de la ovulación resulta de la vasoconstricción que la 5-HT provoca en el ovario, y el bloqueo del paso de las hormonas hacia la gónada (Wilson y McDonald, 1974).

A la 5-HT también se le relaciona con el aumento y disminución del flujo sanguíneo del ovario, ya que se ha observado que cuando se mantiene la arteria ovárica de cerdo con un flujo constante de sangre o con solución fisiológica en presencia de 5-HT, se estimula o inhibe el flujo sanguíneo. En la fase lútea se presenta mayor sensibilidad de los vasos sanguíneos a la amina y en la fase periovulatoria disminuye. Los autores sugieren que la respuesta de los vasos sanguíneos del ovario depende del estado funcional de los mismos y no está relacionado con las hormonas presentes en la sangre (Dynarowicz y col., 1988).

El agregado de LH y 5-HT a células del cuerpo lúteo de vaca en cultivo, estimula la secreción de P<sub>4</sub>, efecto que es revertido por el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>1</sub> y 5-HT<sub>2</sub> con mianserina (Battista y Condon, 1986). Resultados similares fueron obtenidos por Koppan y colaboradores (2004), cuando a células de la granulosa del ovario de mujer fueron estimuladas con LH, FSH y 5-HT. Las células de la granulosa humanas luteinizadas expresan el receptor 5-HT<sub>7</sub> (Graveleau y col., 2000), el cual activa a la adenilato ciclasa (AC), enzima que participa en la cascada de señalización que interviene en la esteroidogénesis (Bogan y Niswender, 2007; Amsterdam y col., 2003). La administración por vía oral a ratas adultas de ketanserina, un antagonista de los receptores 5-HT<sub>2</sub>, se traduce en la menor concentración de P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub> en el suero (Tanaka y col., 1993). Los efectos que la 5-HT ejerce sobre la síntesis de hormonas esteroides dependen del tipo de receptor al cual se une.

## **Planteamiento del Problema**

La 5-HT participa en la regulación de la conexión del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, dado que modula la secreción de GnRH, LH, FSH, P<sub>4</sub>, T, E<sub>2</sub> y la ovulación. Las acciones de la 5-HT en sus órganos o células blanco son mediadas por su unión a receptores de membrana, que hasta el momento se clasifican en siete clases con 14 subtipos.

En el aparato reproductor de la hembra la 5-HT se localiza en el útero, oviducto y ovario. Este órgano posee la maquinaria enzimática necesaria para la síntesis, liberación y recaptura de la 5-HT. La inyección sistémica o en la bursa del ovario de 5-HTP incrementa la concentración de P<sub>4</sub> y disminuye la de E<sub>2</sub> en suero. En el ovario de ratas de 30 días de edad el bloqueo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub> resulta en la disminución en la concentración de E<sub>2</sub>.

Existen fármacos que permiten aumentar la concentración de 5-HT en las células y potenciar la actividad del sistema serotoninérgico, como son los ISRS. Dentro de ésta familia de medicamentos se encuentra la FLX la cual es utilizada para el tratamiento de diversas patologías mentales que además de inhibir la recaptura de 5-HT actúa como antagonista de algunos receptores serotoninérgicos y tiene una vida media larga en comparación con la de otros miembros de la familia de los ISRS.

Existe poca información sobre los efectos del incremento en la concentración de serotonina en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario inducidos por la FLX, particularmente sobre las funciones del ovario. Por lo anterior en el presente estudio se evaluaron los efectos de la inyección de FLX, en ratas de 30 días de edad sobre la secreción de P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub>, la expresión del gen que codifica para el receptor 5-HT<sub>1D</sub>, el crecimiento folicular, el inicio de la pubertad y la primera ovulación.

Los resultados que se generen en el presente estudio contribuirán al conocimiento de los efectos del incremento en la concentración de serotonina inducidos por los ISRS en el aspecto reproductivo de la hembra.

### **Hipótesis**

Dado que la serotonina modula las funciones del eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-ovario, entonces el aumento de la concentración de 5-HT en el sistema hipotalámico-hipofisario-ovárico provocado por la inyección de FLX, resultará en la alteración del inicio de la pubertad, de la ovulación y de la secreción de hormonas esteroides sexuales.



### **Objetivo General**

Evaluar los efectos de la inyección de FLX en la rata hembra prepúber, sobre la actividad del sistema serotoninérgico del hipotálamo, hipófisis y ovario, en el inicio de la pubertad, la primera ovulación y la concentración de P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub>.

### **Objetivos Particulares**

Analizar los efectos de la inyección intraperitoneal de FLX sobre la concentración de 5-HT y su metabolito el 5-HIAA en el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios.

Analizar los efectos de la inyección intraperitoneal de FLX sobre la edad del inicio de la pubertad, del primer estro vaginal y el número de ovocitos liberados por animal ovulante.

Evaluar los efectos de la inyección intraperitoneal de FLX sobre la secreción de P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub>.

Analizar los efectos de la inyección intraperitoneal de FLX sobre la diferenciación del folículo ovárico.

Evaluar los efectos de la inyección intraperitoneal de FLX sobre la expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub> por RT-PCR en el ovario.

## **Materiales y Métodos**

**Animales.** Se utilizaron ratas hembra de 30 días de edad de la cepa CIIZ-V mantenidas en condiciones controladas de iluminación (14 horas luz y 10 horas oscuridad) con acceso libre a la madre hasta el momento del destete (21 días) y posteriormente al alimento y agua. Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales: inyectados con solución salina (VH) o inyectados con 5 mg/kg de FLX (Sigma Chemical, St Louis, USA), la dosis mínima efectiva para modificar a la proteína SERT en SNC (Caccia y cols., 1990; Bouet y cols., 2011). Como grupos de comparación se emplearon animales inyectados con el VH.

**Experimento 1 (Administración aguda de FLX).** Hembras de 30 días de edad recibieron la inyección de VH o de una dosis de 5 mg/kg FLX. Los animales fueron sacrificados a las 24, 48 o 72h posteriores al tratamiento.

**Experimento 2 (Administración sub-crónica de FLX).** Animales de 30 días de edad fueron inyectados con VH o con 5 mg/kg de FLX a los 30, 31, 32 y 33 días de edad y se sacrificaron en el día del primer estro vaginal.

**Pubertad.** A los animales de los diferentes grupos experimentales se les registró el día de la apertura vaginal, a partir de ese momento se tomaron frotis vaginales diariamente. Los animales se sacrificaron cuando los frotis vaginales presentaron células cornificadas, entre las 12:00 y la 13:00 h del día del primer estro vaginal.

**Procedimiento de Autopsia.** Los animales de los diferentes grupos se sacrificaron por decapitación, se colectó la sangre del tronco, se dejó reposar durante 20 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, se colectó el suero y se almacenó a -20°C, hasta la posterior cuantificación de LH, FSH, P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub>. Al momento de la autopsia se disecaron los oviductos y se contó el número de ovocitos con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se disecaron los ovarios los cuales fueron utilizados para la cuantificación de 5-HT y sus metabolito el 5-HIAA, fijados en bouin para el análisis del desarrollo folicular o bien fueron almacenados en tubos de polietileno estériles a -70 ° C para evaluar la expresión del gen que codifican para el receptor 5-HT<sub>1D</sub>.

**Estudio del Desarrollo Folicular.** Los ovarios de animales VH o tratados con FLX sacrificados 72h o al primer estro fueron fijados en Bouin, se deshidrataron e incluyeron en parafina, se realizaron cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$  los que se montaron en portaobjetos cargados con albumina y se tiñeron con hematoxilina-eosina para el análisis de la población folicular, el cual se realizó con la ayuda de un microscopio y un ocular micrométrico, se midió el diámetro mayor y el perpendicular a este de los folículos que presentaron el ovocito con su núcleo y nucléolo definido, los folículos fueron clasificados en cinco categorías: clase 1 (<100  $\mu\text{m}$ ), clase 2 (101-199  $\mu\text{m}$ ), clase 3(200-349 $\mu\text{m}$ ), clase 4 (350-499  $\mu\text{m}$ ) y clase 5 (>500  $\mu\text{m}$ ) (Osman, 1985). El cálculo del diámetro promedio se hizo de la siguiente forma:

$$\text{Diámetro promedio} = (\text{Diámetro mayor} + \text{Diámetro perpendicular})/2$$

Los folículos también se clasificaron en sanos o atrésicos. Se consideró un folículo atrésico cuando presentaban alguna de las siguientes características: alteración en la morfología del ovocito, engrosamiento de las células de la teca, picnosis en las células de la granulosa y descamación de células de la granulosa hacia el antro folicular (Hubbard y Oxberry, 1991)

**Expresión del Receptor 5-HT<sub>1D</sub> por la Técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (RT-PCR).** El ARN de los ovarios VH o FLX fue aislado en tubos estériles de polietileno. El ARNm fue aislado de acuerdo al protocolo de TRIzol® (Anexo 1). Los ARNs fueron retrotranscritos usando el sistema de RT-PCR (GeneAmp®, USA) para ello 5 $\mu\text{l}$  de la reacción fueron sometidos a 42°C por 15min, 99°C por 5min y 5°C por 5min. La PCR se realizó con 25 $\mu\text{l}$  por 35 ciclos, 30 segundos a 95°C, alineamiento de oligonucleótidos 30 segundos a 57°C (cuadro 2) y la extensión por 30 seg a 72°C. 5 $\mu\text{l}$  de cada reacción fueron tenidos con bromuro de etidio y se cargaron en un gel de agarosa al 1%. El análisis densitométrico de los geles se realizó con el programa Kodak 1D en el equipo Gel Logic 1500 Imaging S.

**Cuadro 2. Oligonucleótidos utilizados para la amplificación de los genes:  $\beta$ -Actina y 5-HT<sub>1D</sub>. Pares de bases (pb), Temperatura de alineamiento (Tm; melting temperature).**

Gen	Oligonucleótidos	pb	Tm	Referencias
$\beta$ -Actina	F: 5'-CGGAACCGCTCATTGCC-3' R: 5'-ACCCACACTGTGCCCATCTA-3'	285	57°C	Kulikov y col., 2005.
5-HT <sub>1D</sub>	F: 5'-CGACTACATTTACCAGGACTCCATC-3' R: 5'-CCAGCGAGGCGATCAGGTAGTTAG-3'	215	58.7°C	Jennings y col., 2004.

**Cuantificación de 5-HT y su metabolito, el 5-HIAA por Cromatografía de Líquidos (HPLC).** A la autopsia se extrajo el cerebro, se congeló y se disecó el hipotálamo [(anterior y medio) Paxinos y Watson, 1997], la hipófisis y los ovarios. Todas las estructuras se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de 5-HT y su metabolito, el 5-HIAA. El hipotálamo anterior (HA) e hipotálamo medio (HM), los ovarios y las hipófisis se pesaron y homogeneizaron en 300 $\mu$ l ó 150 $\mu$ l de ácido perclórico (HClO<sub>4</sub>) al 0.1 N, respectivamente, se centrifugaron a 12,500 rpm a -4°C durante 30 min, el sobrenadante de las muestras de hipotálamo y ovario se filtraron utilizando filtros de celulosa regenerada de tamaño de poro de 0.45 $\mu$ m, se inyectaron 100 $\mu$ l del filtrado al sistema de cromatografía de líquidos. El sobrenadante de las muestras de hipófisis no se filtró y se inyectaron 100 $\mu$ l al sistema de cromatografía de líquidos para la evaluación de las concentraciones de 5-HT y del 5-HIAA.

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

**Cuantificación de Gonadotropinas y Hormonas Esteroides.** La LH y FSH fueron evaluadas por radioinmunoanálisis (RIA) usando la técnica del doble anticuerpo. El protocolo y los reactivos utilizados fueron proporcionados por el National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). Los resultados se expresaron como ng/ml. La variación del coeficiente intra e interensayo fueron de 5.74 y 7.0% para FSH y de 6.82 y 9.32% para LH, respectivamente.

Se tomaron 100µl de suero para cada hormona, a los cuales se les adicionaron 100µl de sus respectivos anticuerpos y se incubaron durante 24h a temperatura ambiente. Posteriormente se agregaron 100µl del segundo anticuerpo y se incubaron durante 2 horas. Se centrifugaron a -4°C a 3000 r.p.m. por 30 minutos. Se decantó el sobrenadante, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en contador de centelleo para realizar el conteo.

La cuantificación de P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub> en el suero se realizó por la técnica de ELISA para lo cual se utilizaron kits AccuBind (Monobind Inc. Lake Forest, CA, USA). La concentración de P<sub>4</sub> se expresó en nanogramos por mililitro (ng/ml), mientras que la de T y E<sub>2</sub> se expresó en picogramos por mililitro (pg/ml). Las evaluaciones se realizaron por duplicado.

Para el análisis de P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub> se tomaron 25µl y para T 10µl de suero de los grupos experimentales, se colocaron en los pozos correspondientes de las placas para cada hormona.

Para P<sub>4</sub> y T se agregaron 50µl de reactivo enzimático de progesterona o testosterona en cada pozo donde se encontraba el suero, las placas se colocaron en agitación durante 10-20 seg (P<sub>4</sub>) o 20-30 seg (T). Se adicionaron 50µl de reactivo de biotina de progesterona o testosterona se agitaron durante 10-20seg (P<sub>4</sub>) o 20-30seg (T) respectivamente. Se cubrieron de la luz y se incubaron a temperatura ambiente durante 60min.

Para E<sub>2</sub> se agregaron 50µl de reactivo biotinilado de estradiol, se agitó durante 20-30seg, se cubrió e incubó a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregaron 50µl de reactivo enzimático de estradiol se agito 20-30seg, se protegió de la luz y se incubó a temperatura ambiente durante 90 min.

Para todas las hormonas se eliminó el líquido por aspiración y se agregaron 350µl del buffer de lavado. Este procedimiento se repitió en tres ocasiones.

Posteriormente se adicionaron 100µl de la solución de sustrato y se incubaron a temperatura ambiente durante 20min (P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>) y 15 min (T). Se adicionaron 50µl de la solución de paro y las placas se agitaron durante 15-20 segundos. Se leyó absorbancia de cada pozo a 450nm. La sensibilidad del ensayo para P<sub>4</sub> fue de 0.105 ng/ml, para T de 0.038 ng/ml y para E<sub>2</sub> de 6.5 pg/ml (Cruz y col., 2012).

**Análisis Estadístico de Resultados.** Todos los datos fueron analizados con el programa GraphPad Prism. Los resultados de concentración de LH, FSH, P<sub>4</sub>, T y E<sub>2</sub> en el suero, 5-HT, 5-HIAA y la expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub> se evaluó mediante la prueba de “t” de Student cuando se realizó la comparación entre dos grupos. La cantidad de ovocitos liberados y el número de folículos atrésicos fue evaluada por la prueba de U de Mann-Whitney. Todas las pruebas se consideraron como diferencias significativas aquellas en las que la probabilidad fue igual o menor al 5%.

## **Resultados**

### **Efecto de la inyección aguda de FLX por vía intraperitoneal en la etapa prepuberal.**

Este experimento se diseñó para analizar si en la rata hembra prepúber la inyección de una dosis de FLX incrementa la concentración de serotonina en el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios, además de modificar la secreción de hormonas esteroides sexuales.

#### ***Concentración de 5-HT y del 5-HIAA.***

En el HA de los animales inyectados con FLX, sacrificados a las 24, 48 o 72h postratamiento, no se modificó la concentración de 5-HT, mientras que en el HM de los animales sacrificados a las 24h postratamiento la del 5-HIAA aumentó en comparación con el grupo VH (Figuras 7 y 8).

En la hipófisis de los animales a los que se les inyectó FLX, la concentración de 5-HT o la del 5-HIAA fue similar a la del grupo tratado con VH, mientras que en el ovario de los animales que recibieron FLX y sacrificados a las 24h la concentración del 5-HIAA fue mayor (Figuras 9 y 10).

#### ***Concentración de hormonas esteroides.***

En comparación con el grupo con VH, en los animales inyectados con FLX y sacrificados en los diferentes periodos evaluados, la concentración de P<sub>4</sub> y T fue similar al control, mientras que la de E<sub>2</sub> fue mayor en los animales inyectados con FLX y sacrificados 48 o 72h posteriores al tratamiento (Figura 11).

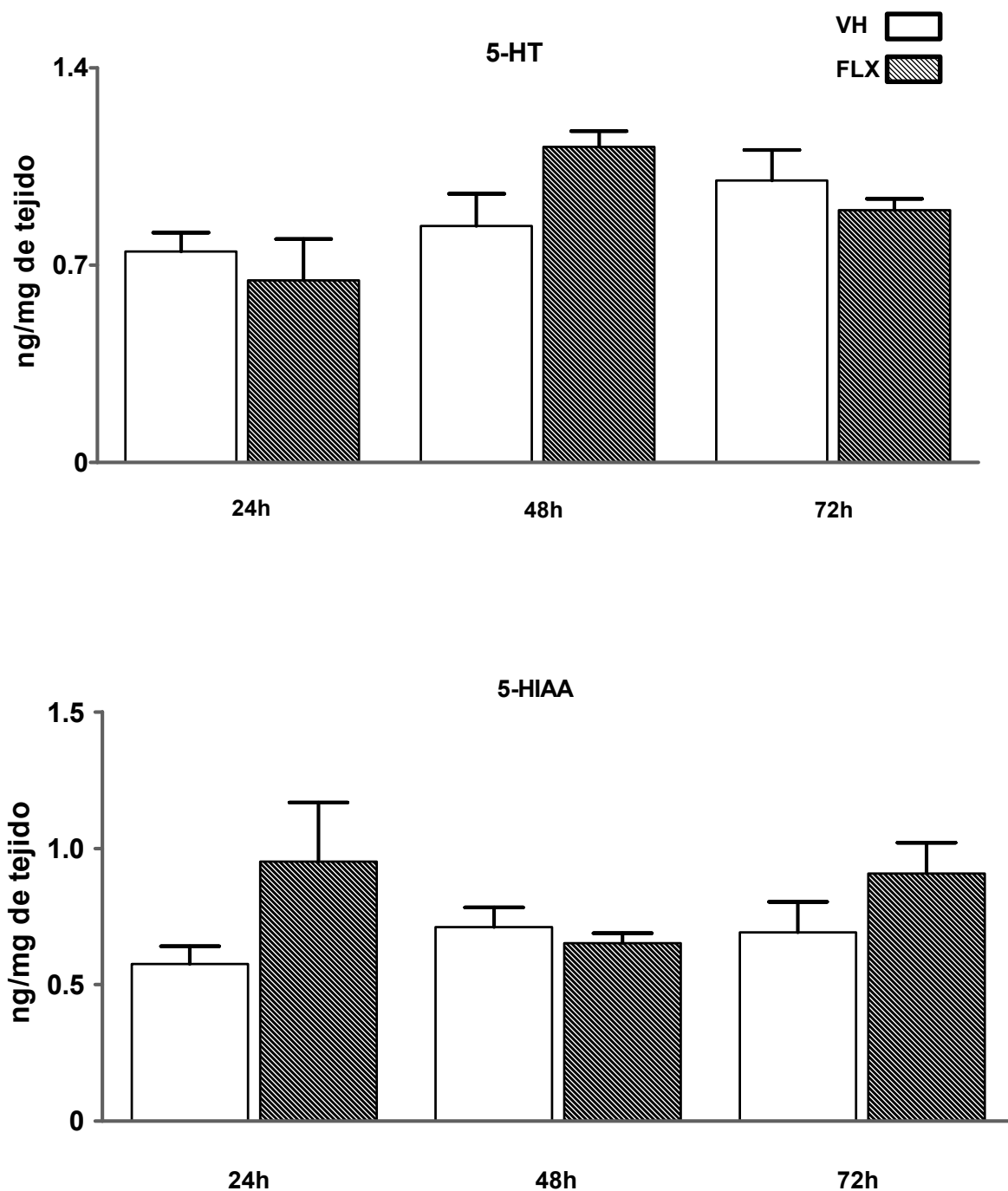
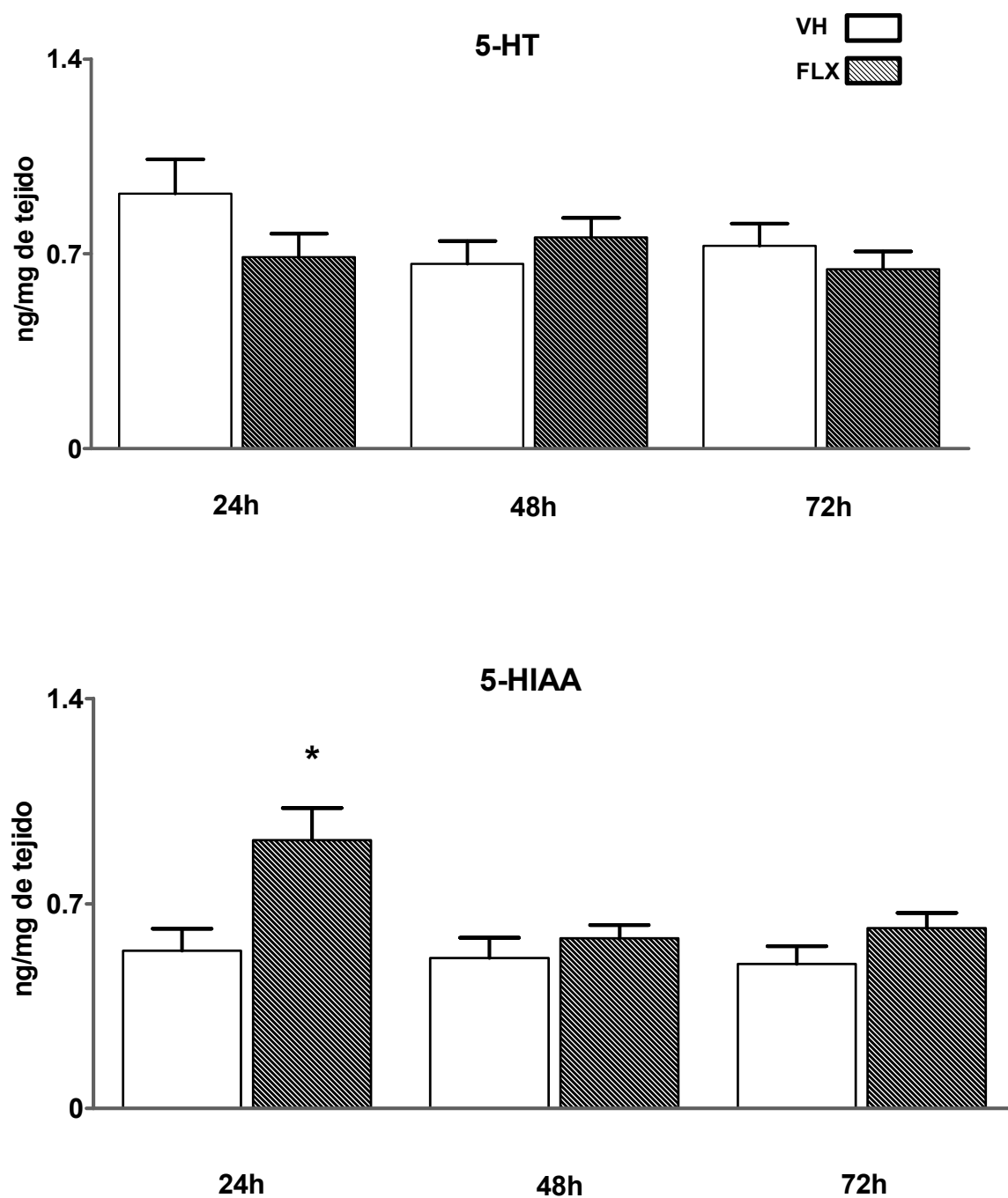


Figura 7. Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo anterior de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas a las 24, 48 ó 72h.





\*  $p < 0.05$  vs. VH (Prueba "t" de Student)

Figura 8. Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo medio de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas a las 24, 48 ó 72h.

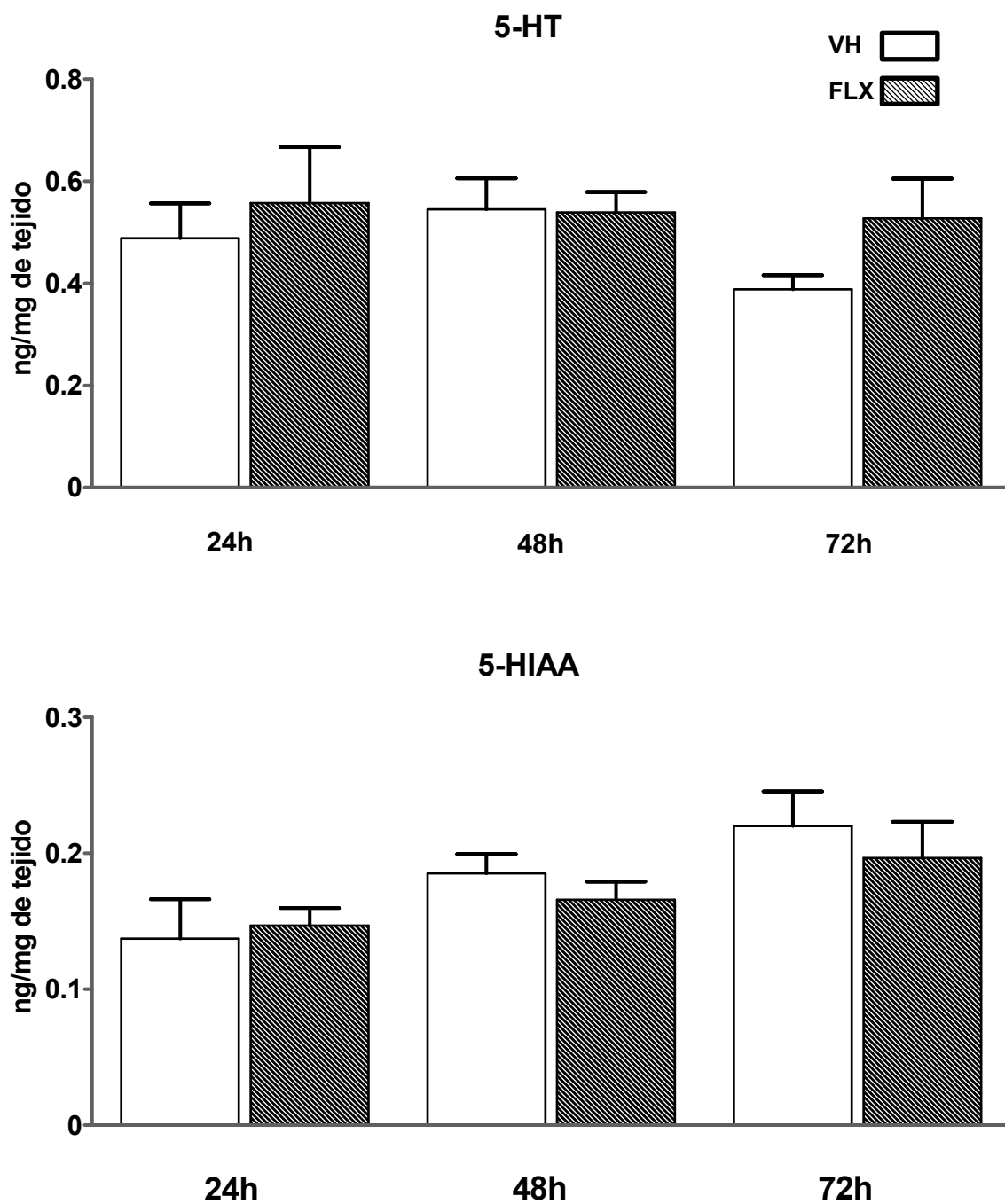
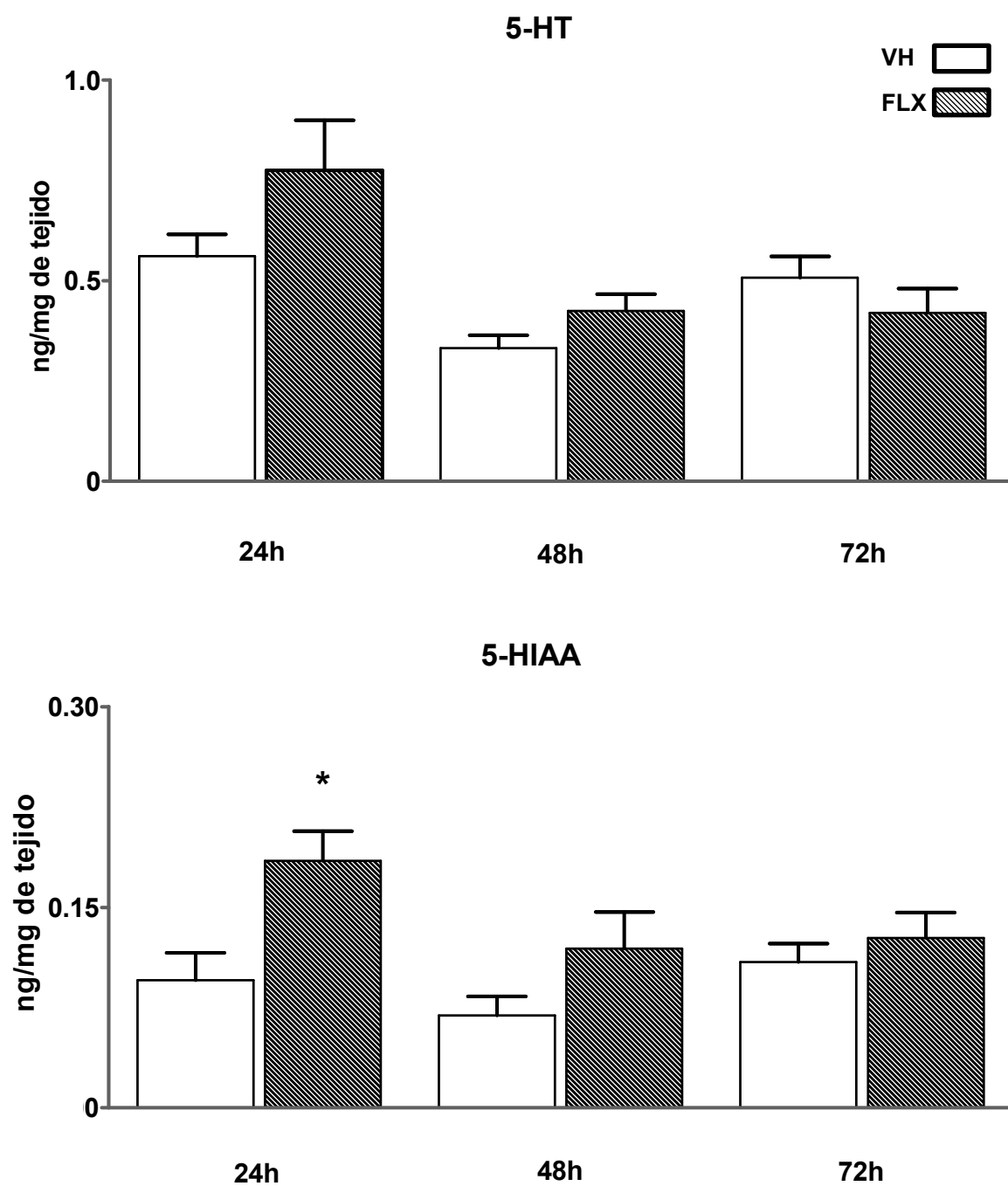
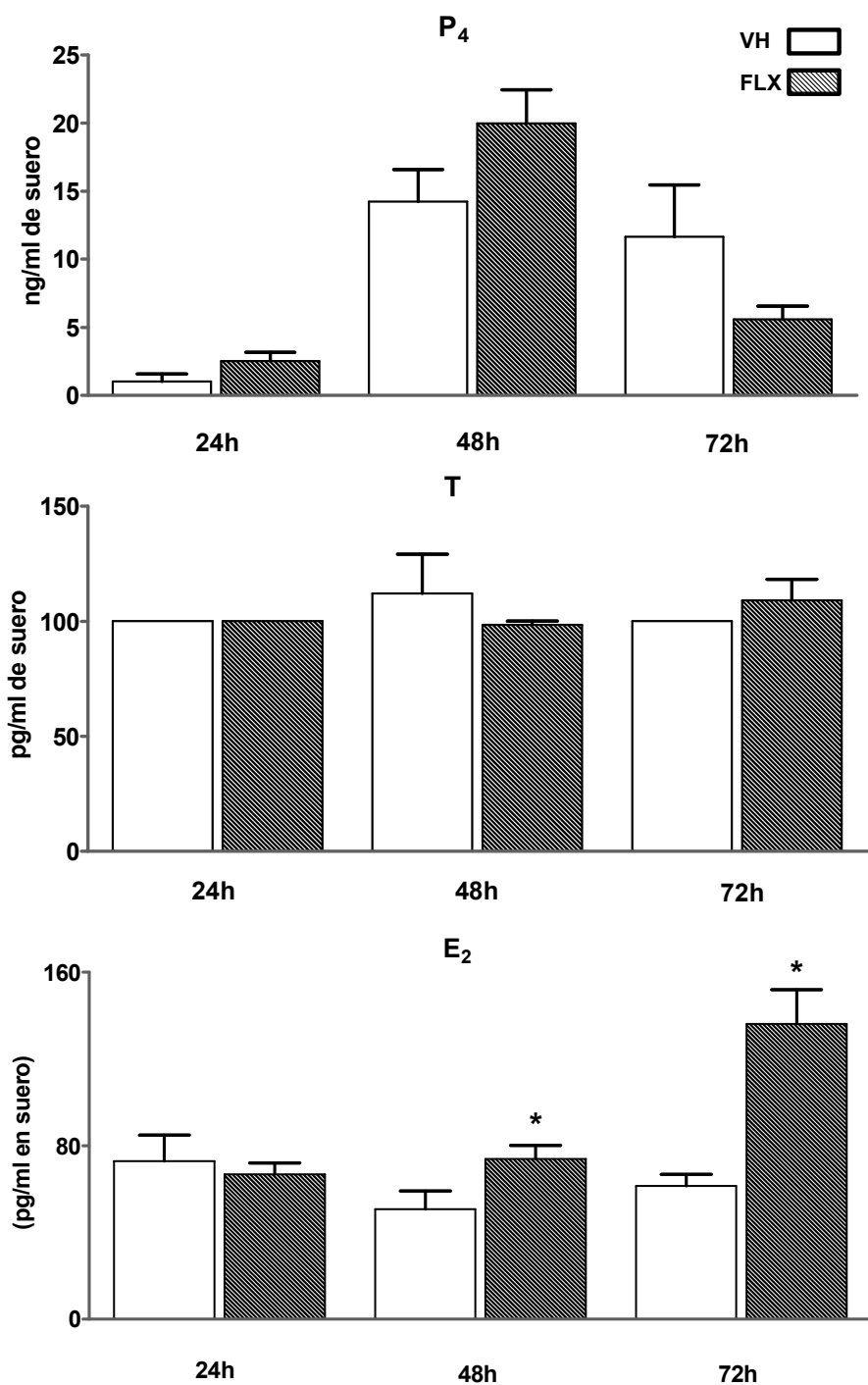


Figura 9. Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas a las 24, 48 ó 72h.



\*  $p < 0.05$  vs. VH (Prueba "t" de Student)

Figura 10. Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de 5-HT y 5-HIAA en el ovario de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas a las 24, 48 o 72h.

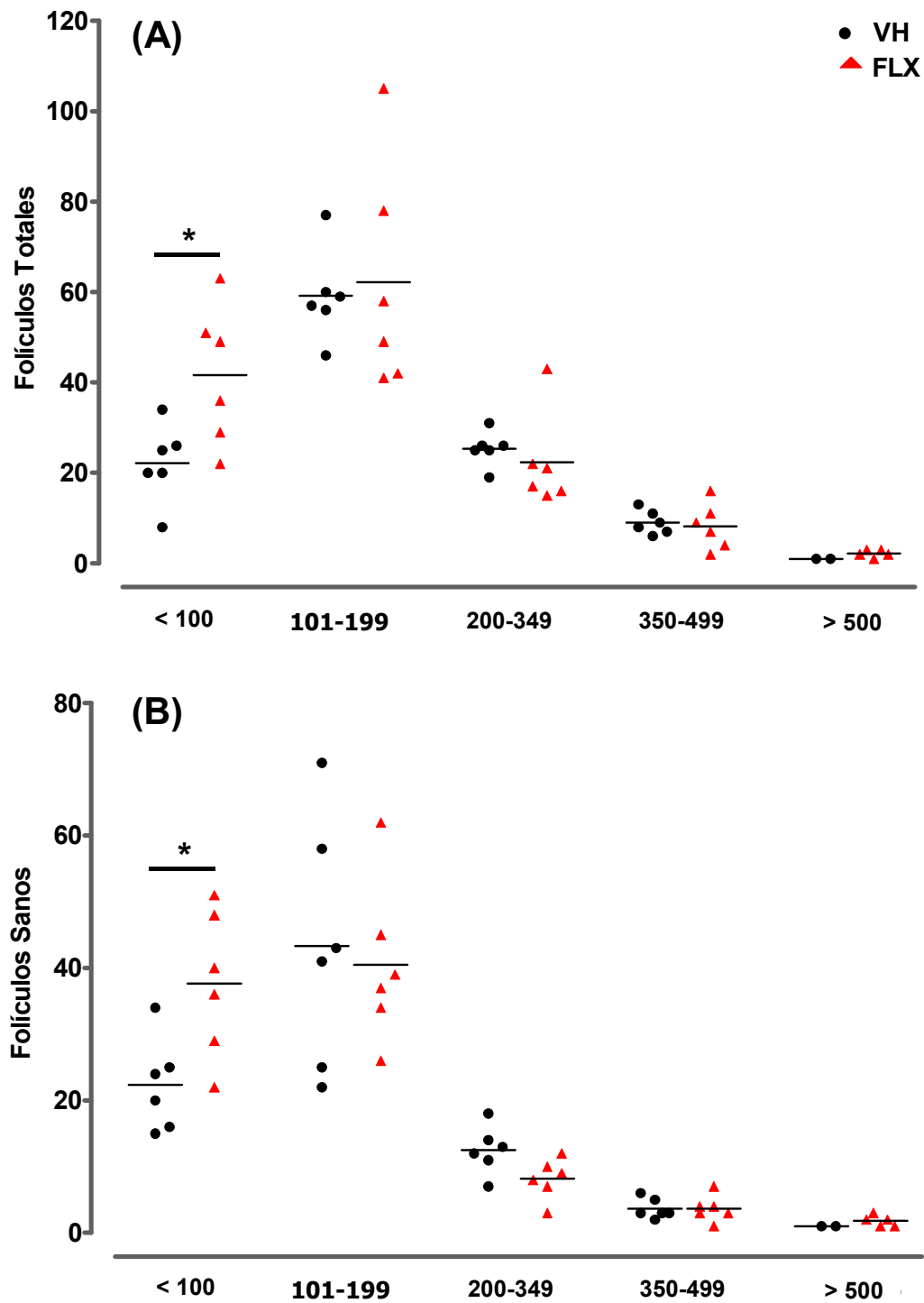


\*  $p < 0.05$  vs. VH (Prueba "t" de Student)

Figura 11. Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de progesterona ( $P_4$ ), testosterona (T) y estradiol ( $E_2$ ) en el suero de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) v sacrificadas a las 24, 48 ó 72h.

***Estructura del ovario (crecimiento folicular).***

En el ovario de los animales inyectados con FLX el número de folículos totales de la clase 1 (<100  $\mu\text{m}$ ) fue mayor que en el grupo inyectado con VH (Figura 12-A). Cuando se analizó el estado de los folículos se observó que el número de folículos sanos fue mayor en los de la clase 1 (<100  $\mu\text{m}$ ) (Figura 12-B) y menor el de los folículos atrésicos.



\*  $p < 0.05$  vs. VH (Prueba "U" de Mann-Whitney)

Figura 12. Número de folículos totales (A) y sanos (B) de los ovarios de ratas tratadas con solución salina (VH) o fluoxetina (FLX) y sacrificadas a las 72h

### **Efecto de la inyección sub-crónica de FLX por vía intraperitoneal en el Inicio de la Pubertad.**

Con el fin de analizar si la administración consecutiva de cuatro dosis de FLX incrementa la concentración de 5-HT en los componentes del eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-ovario en la etapa prepuberal, modifica el inicio de la pubertad y la primera ovulación, se evaluaron los efectos de la administración sub-crónica de FLX.

#### ***Concentración de 5-HT y del 5-HIAA.***

En el HA y HM de los animales que recibieron FLX, sacrificados el día del primer estro vaginal la concentración de 5-HT y la del 5-HIAA fue similar al grupo inyectado con VH (Figura 13).

En la hipófisis de los animales inyectados con FLX, sacrificados al primer estro la concentración de 5-HT fue mayor y la del 5-HIAA menor que en el grupo VH (Figura 14).

En el ovario de los animales inyectados con FLX sacrificados al primer estro, la concentración de 5-HT y la del 5-HIAA fue mayor que en el grupo VH (Figura 15).

#### ***Edad del inicio de la pubertad, la edad del primer estro vaginal y la ovulación.***

La edad de la apertura vaginal de los animales que se inyectaron con FLX fue similar al grupo VH. La edad en que se presentó el primer estro vaginal fue mayor que en grupo de animales inyectados con VH (Figura 16).

En comparación con los animales VH, en el grupo de animales que se les inyectó la FLX no se modificó la proporción de los animales que ovularon en el día del primer estro vaginal (12/14 vs. 14/17, NS), pero el número de ovocitos liberados por animal ovulante fue significativamente menor (Figura 17).

#### ***Concentración de hormonas esteroideas y gonadotropinas***

En el suero de los animales inyectados con FLX, sacrificados al primer estro la concentración de gonadotropinas (FSH, VH  $6.6 \pm 1.41$  vs. FLX  $4.4 \pm 1.50$ ; LH, VH  $0.21 \pm 0.07$  vs. FLX  $0.3 \pm 0.09$ , NS),  $P_4$ , T y  $E_2$  fue similar al grupo de animales inyectados con VH (Figura 18).

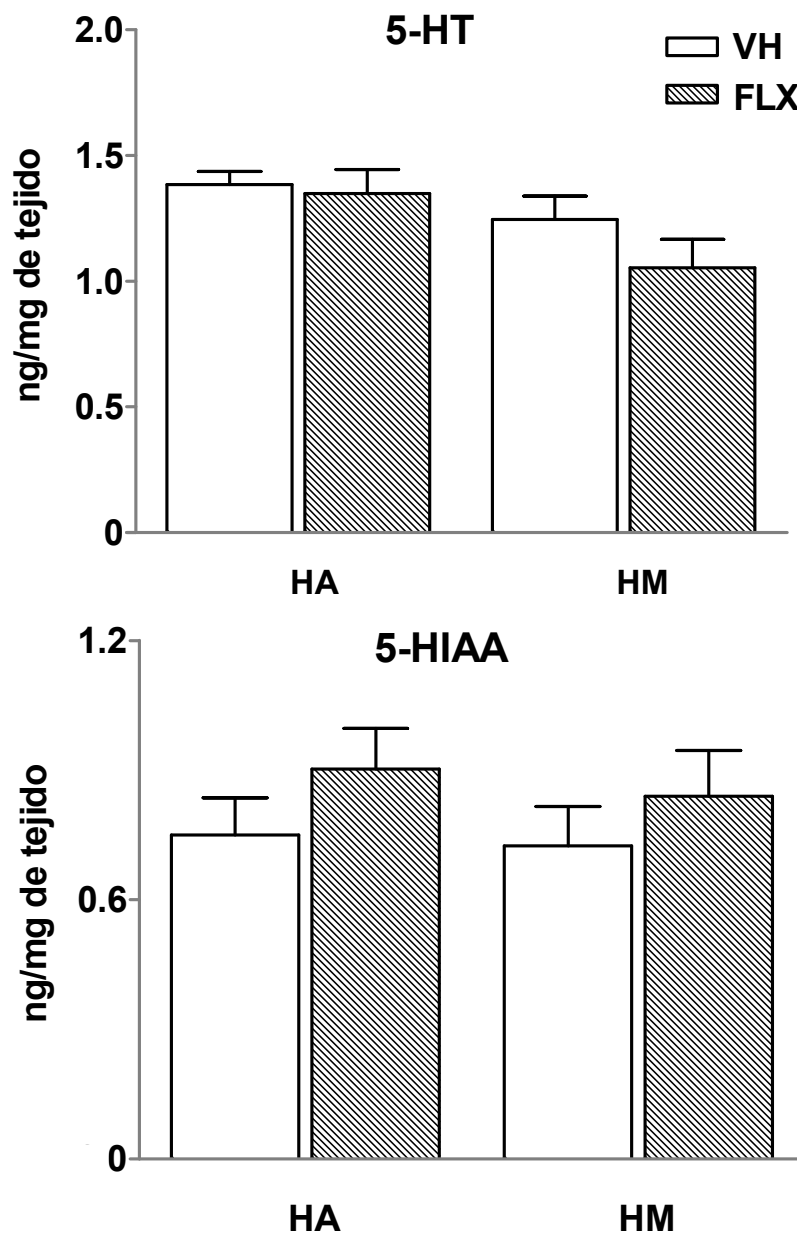
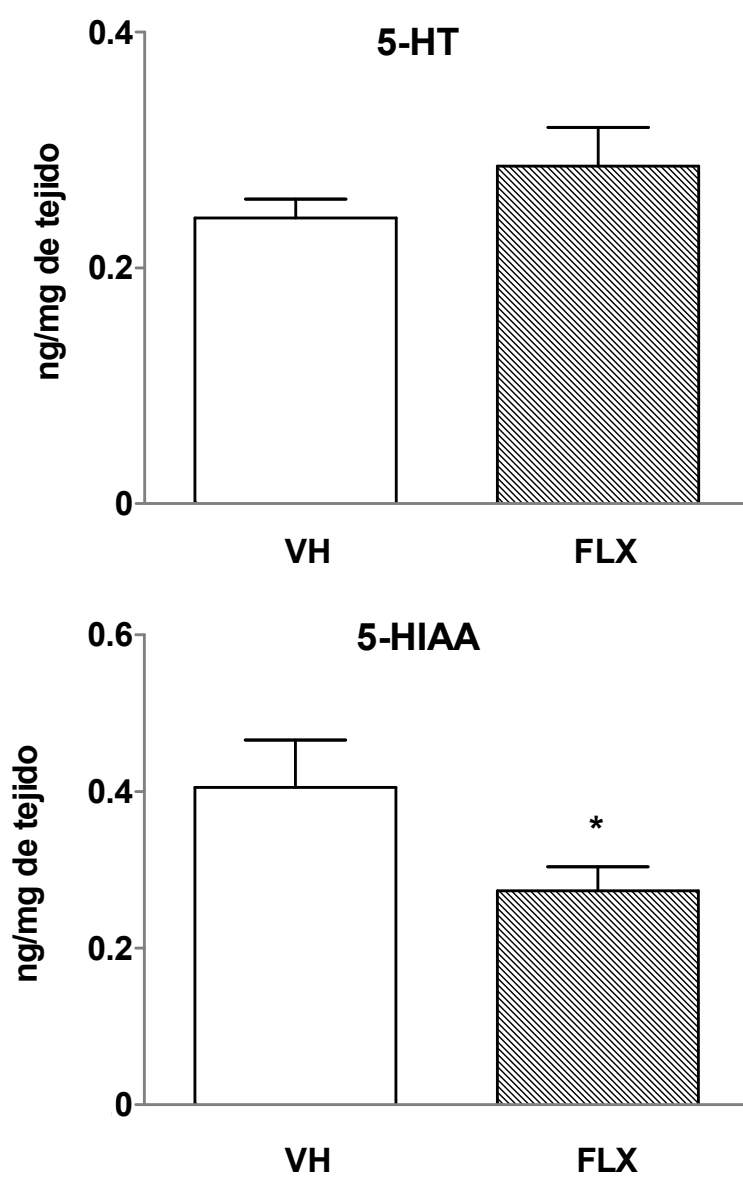


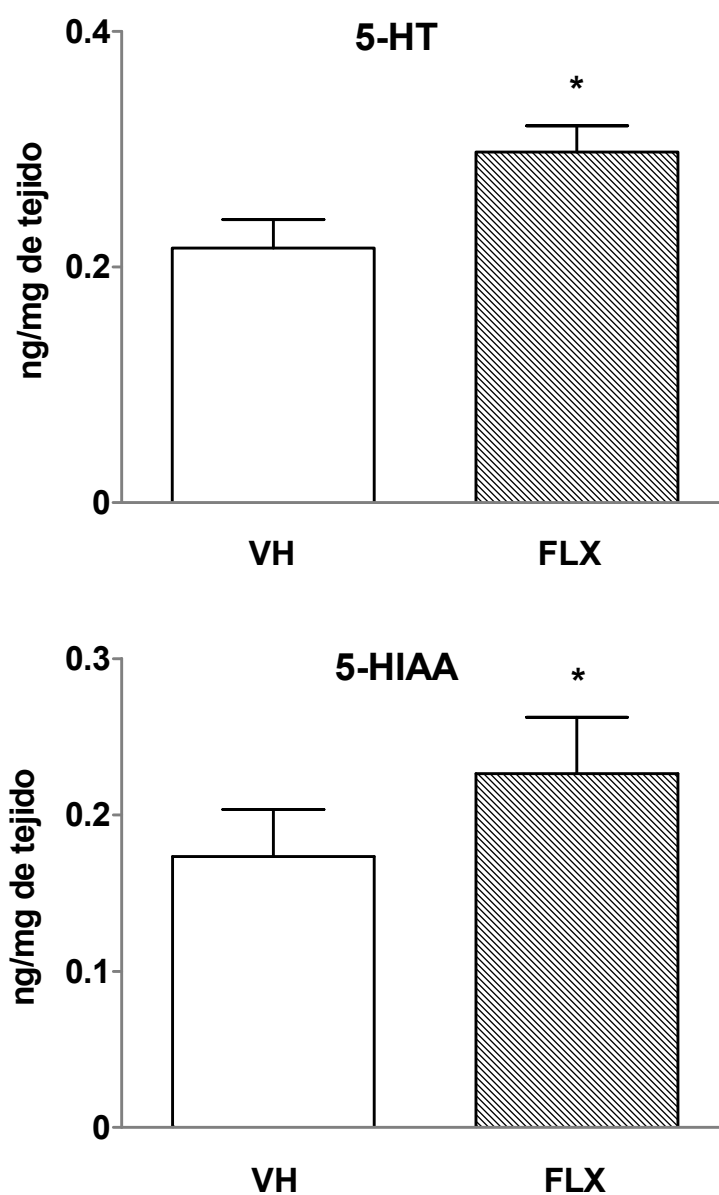
Figura 13.- Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM) de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.





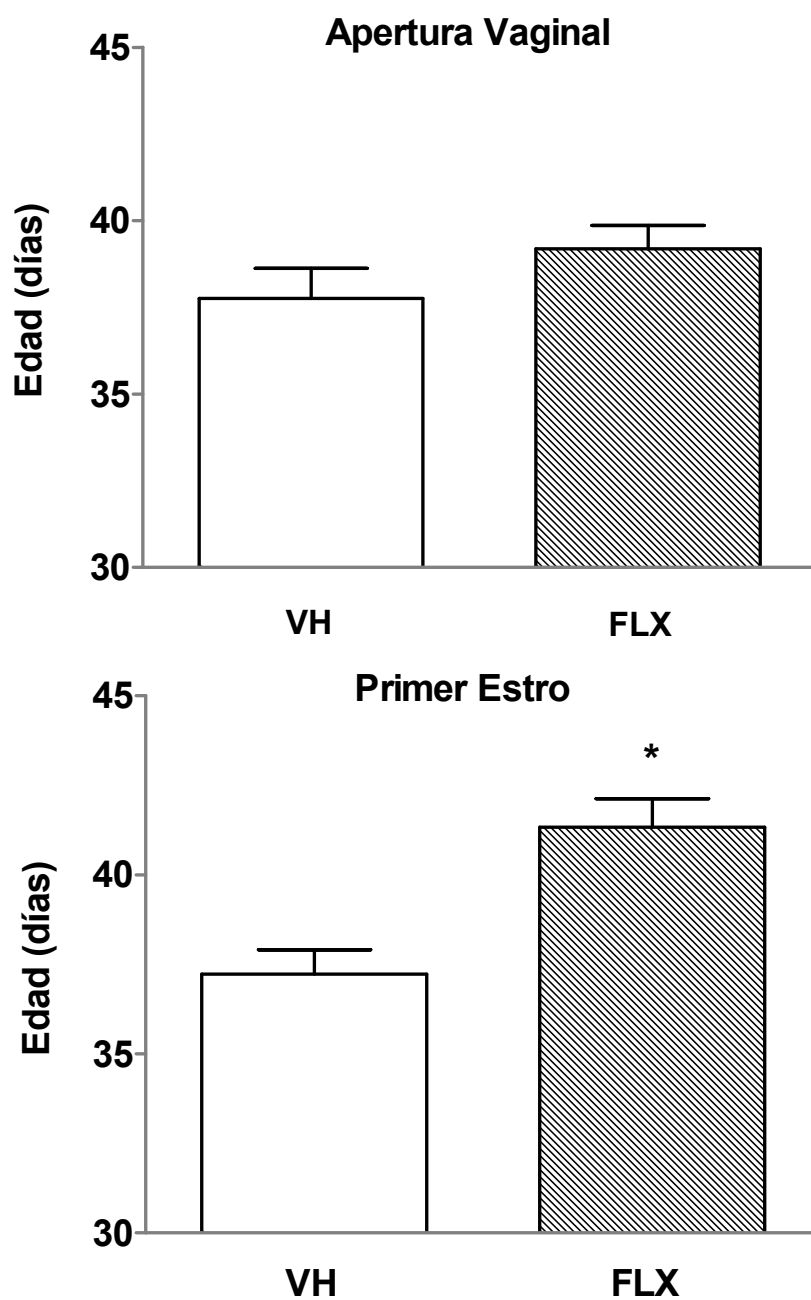
\*  $p < 0.05$  vs. VH (Prueba "t" de Student)

Figura 14.- Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



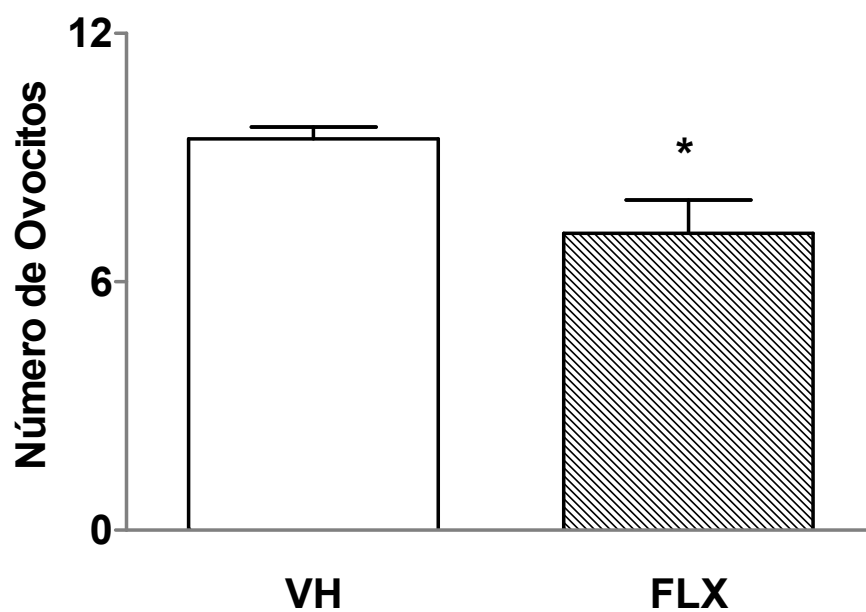
\*  $p < 0.05$  vs. VH (Prueba "t" de Student)

Figura 15.- Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en ovario de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



\*  $p < 0.05$  vs. VH (prueba "U" Mann-Whitney)

Figura 16. Edad de la apertura vaginal y del primer estro de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



\*,  $p < 0.05$  vs. Control (prueba "U" Mann-Whitney).

Figura 17. Número de ovocitos liberados de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

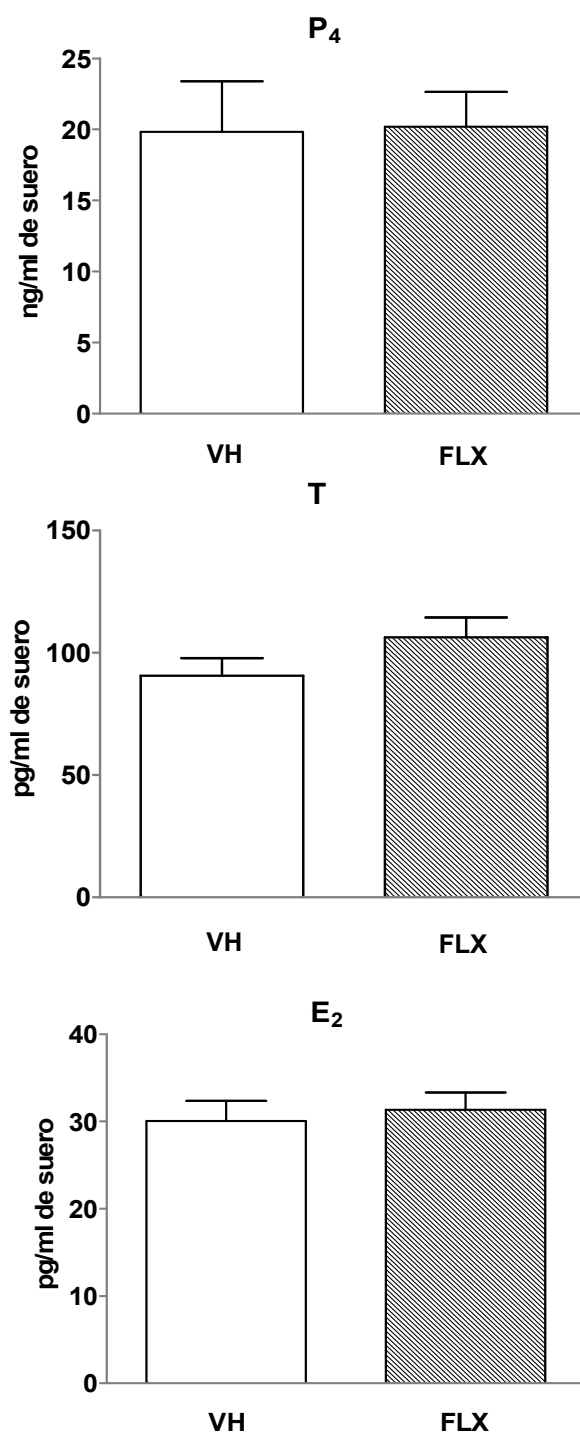
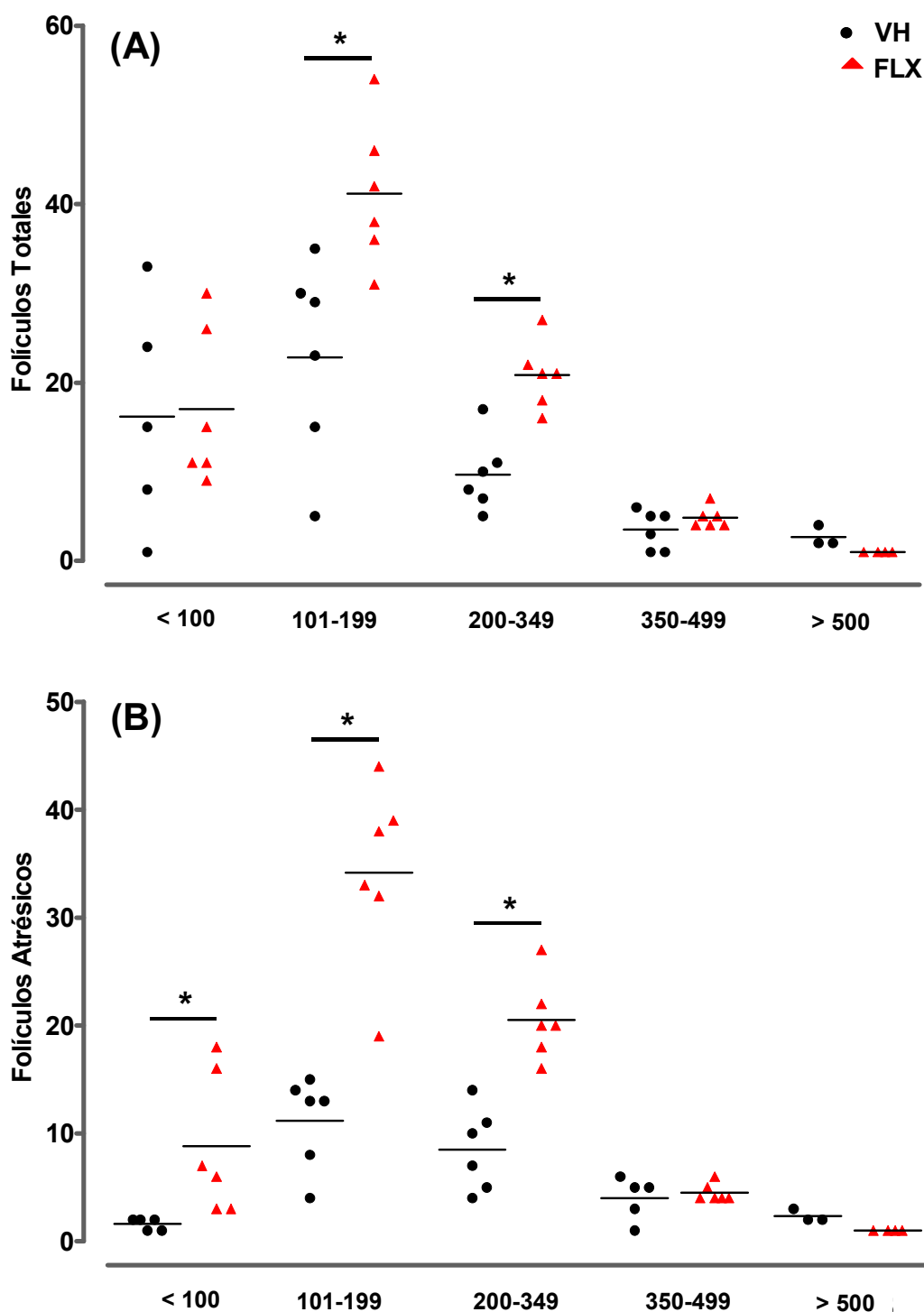


Figura 18.- Concentración (Media  $\pm$  e.e.m.) de Progesterona (P<sub>4</sub>), Testosterona (T) y Estradiol (E<sub>2</sub>) en el suero de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

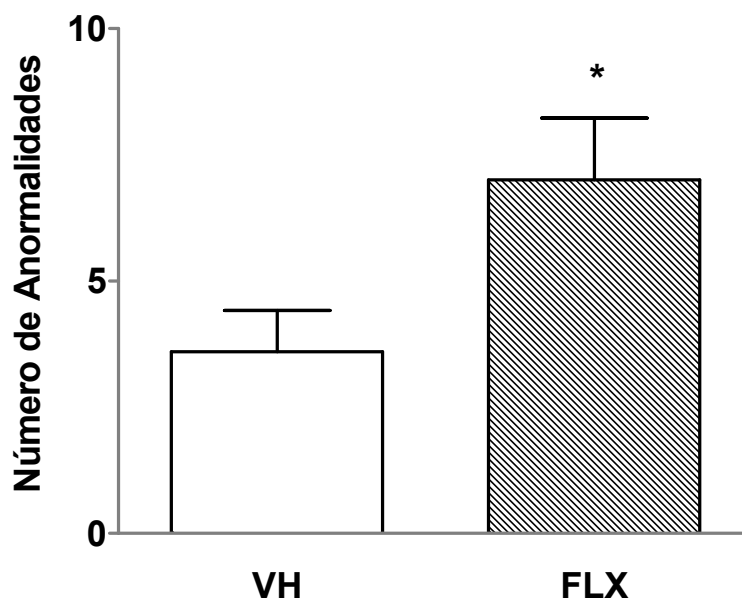
***Estructura del ovario (crecimiento folicular).***

El número de folículos totales de las clases 2 (101-199  $\mu\text{m}$ ) y 3 (200-349 $\mu\text{m}$ ) fue mayor en el ovario de los animales inyectados con FLX que en el ovario de los animales inyectados con VH (figura 19-A). Cuando se analizó el estado de los folículos se observó que el número de folículos atrésicos en las clases 1 (<100  $\mu\text{m}$ ), 2 (101-199  $\mu\text{m}$ ) y 3 (200-349 $\mu\text{m}$ ) fue mayor (Figura 19-B). En la figura 20 se muestra el tipo de anomalías que se presentaron con mayor frecuencia en los folículos de los ovarios de los animales tratados con FLX, las cuales fueron picnosis de células de la granulosa, engrosamiento de las células de la teca, dos o más ovocitos en un mismo folículo, fragmentación del ovocito y ovocitos con dos núcleos y nucléolos. En comparación con el grupo VH, en los animales inyectados con FLX el número de anomalías fue mayor (particularmente la fragmentación del ovocito y la presencia de múltiples ovocitos en un mismo folículo) (Figura 21).



\* p<0.05 vs. VH (Prueba "U" de Mann-Whitney)

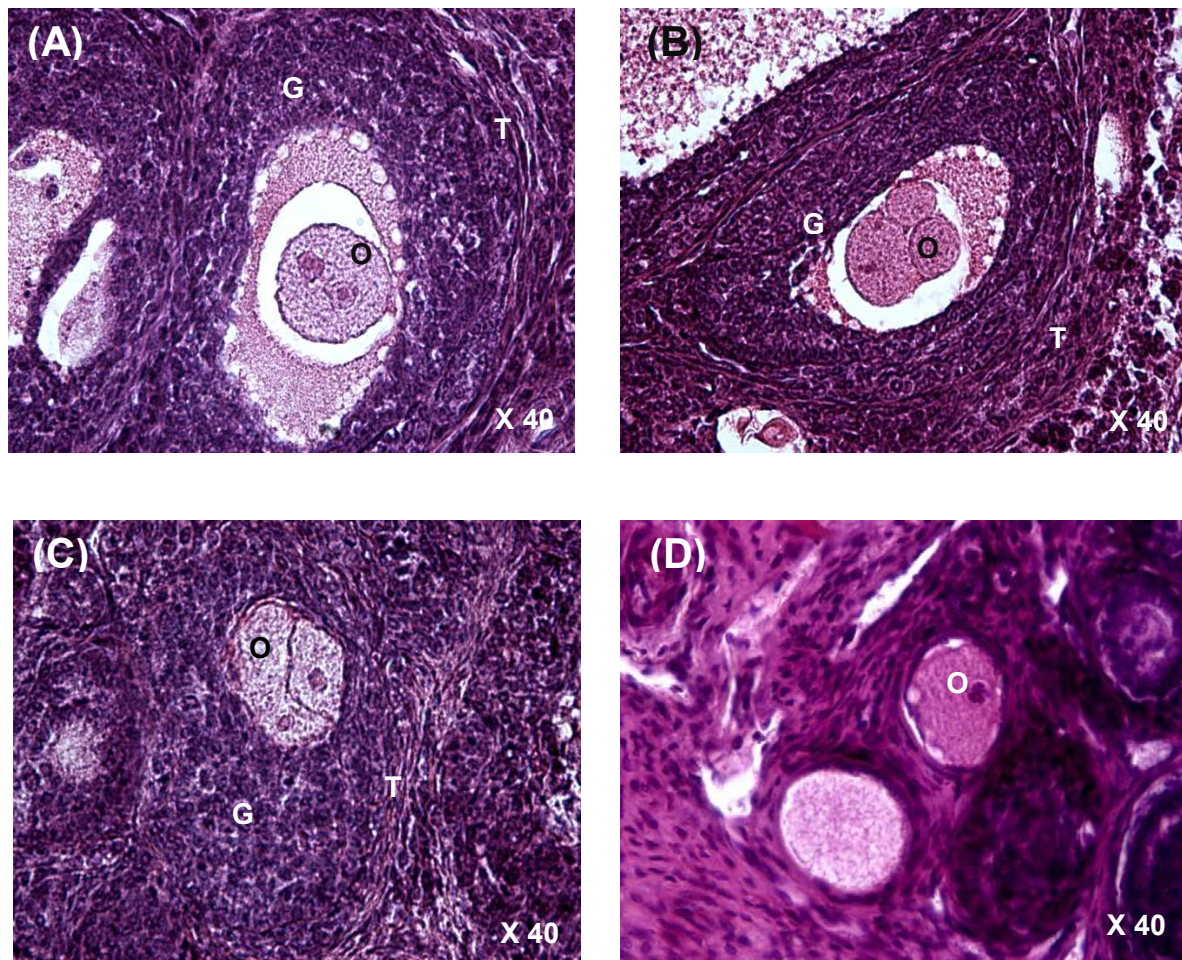
Figura 19. Promedio del número de folículos totales (A) y atrésicos (B) de los ovarios de las ratonas tratadas con solución salina (VH) o fluoxetina (FLX) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



\*  $p < 0.05$  vs. Control (prueba "U" Mann-Whitney).

Figura 20. Número de anomalías presentes en el ovario de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.





**Figura 21. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario de ratas tratadas con fluoxetina (FLX).** Se observan distintas anomalías. (A) Presencia de dos núcleos y nucléolos en un mismo ovocito, (B) fragmentación del ovocito, (C) múltiples ovocitos en un mismo folículo, y (D) ovocitos sin células del folículo, sacrificadas en el día del primer estro vaginal, teñidos mediante la técnica de Hematoxilina-Eosina donde se observan los tipos de anomalías que se presentan. Se observa el ovocito (O), las células de la granulosa (G) y las células de la teca (T).

### Expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub>

El análisis mediante RT-PCR mostró la presencia del ARNm para el receptor 5-HT<sub>1D</sub> en los ovarios de las ratas de la cepa CIIZ-V. El tratamiento con FLX no modificó la expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub> en el ovario de la rata prepúber (Figura 22)

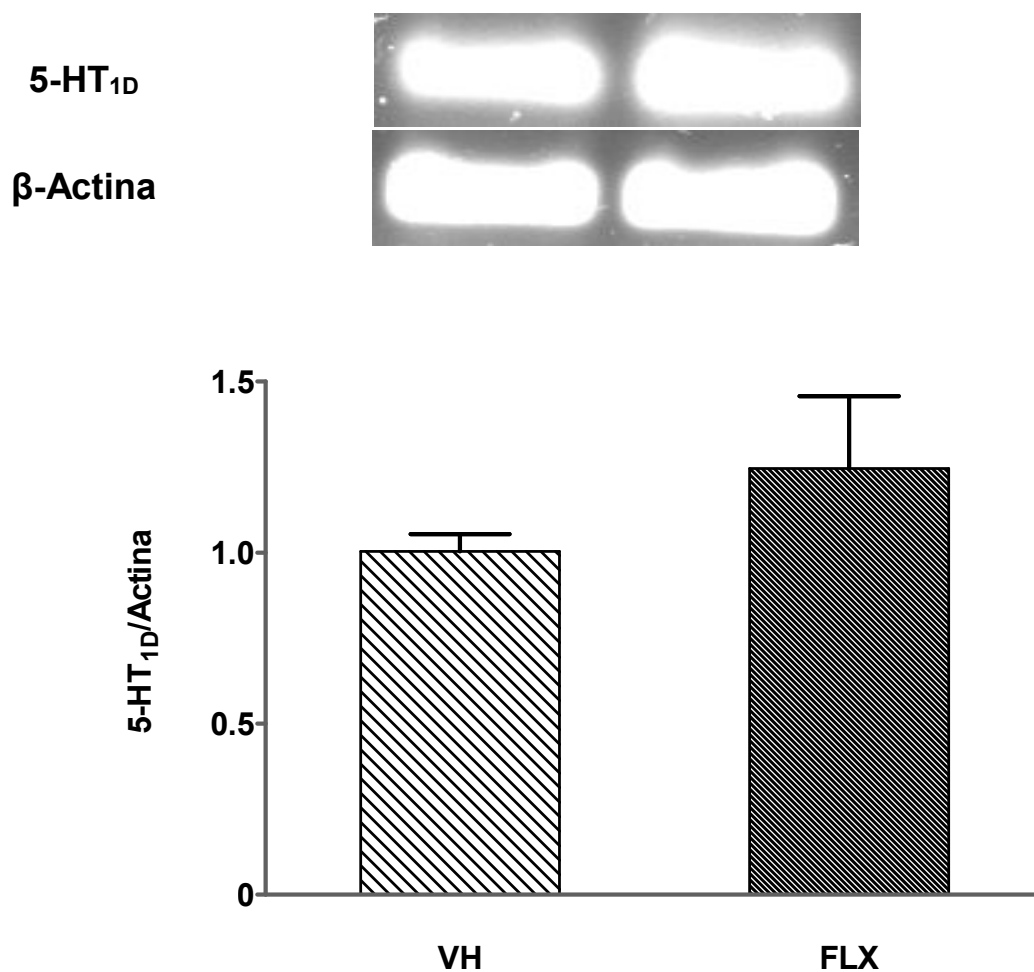


Figura 22. Expresión del ARNm para el receptor 5-HT<sub>1D</sub>. Bandas amplificadas para el control, la  $\beta$ -actina y para el receptor 5-HT<sub>1D</sub> RT-PCR medidas en ARNm extraído de ovarios de ratas tratadas con solución salina (VH) o con fluoxetina (FLX) sacrificadas el día del primer estro vaginal.

## Discusión

En nuestro estudio se mostró que la inyección de FLX estimuló el incremento de la concentración de 5-HT en el ovario. Se propone que el menor número de ovocitos liberados que se observó el día del primer estro vaginal, el mayor número de folículos pequeños y medianos así como la presencia de diferentes anomalías en la gónada son el efecto del estímulo del receptor 5-HT<sub>1D</sub> como resultado de la mayor concentración de 5-HT.

La falta de cambios en la concentración de serotonina en el hipotálamo de los animales inyectados con FLX, sacrificados a las 24, 48, 72h o en el día del primer estro vaginal, posiblemente son el resultado de la disminución en la síntesis de serotonina en el núcleo del rafé. Esta idea se basa en el hecho de que el NDR, es la estructura que posee mayor número de neuronas serotoninérgicas y cuyas proyecciones son la principal fuente de serotonina del hipotálamo (Harsing, 2006), donde la FLX además de inhibir la recaptura de serotonina, disminuye la expresión de la TPH, enzima limitante en la síntesis de 5-HT. (MacGillivray y col., 2010). Además la isoforma 2 de la TPH, presente en SNC tiene baja afinidad por el Trp (McKinney y col., 2005). Conjuntamente nuestros resultados y los reportados en la literatura nos permiten proponer que en los animales que se les administró la FLX, disminuyó la síntesis de 5-HT.

El efecto farmacológico de la FLX es el de incrementar la concentración de 5-HT (Blier y col. 1998). El hecho de que no se modificara la concentración de 5-HT en hipófisis de los animales a los que se les inyectó una dosis de FLX, sacrificados a las 24, 48 o 72h, probablemente es el resultado de que una sola dosis no fue suficiente para estimular el efecto farmacológico.

La mayor concentración de 5-HT que se observó en la hipófisis de los animales tratados con FLX, sacrificados al primer estro vaginal coincide con lo reportado en la literatura. Nunez y colaboradores (1981) mostraron que al incubar adenohipófisis de murciélago con FLX se observa una mayor cantidad de gránulos que contienen 5-HT en los gonadotropos. Además de recapturarse en la hipófisis (Johns y col., 1982), la 5-HT también se sintetiza. Cortés (2009) mostró que la inyección intraperitoneal de 5-HTP, precursor de la 5-HT, a ratas hembras de 30 días de edad incrementa la concentración de esta amina en la hipófisis de los animales tratados, donde la 5-HT sintetizada in situ es otra fuente de este neurotransmisor. También, en estudios previos de nuestro laboratorio, se mostró que en la rata hembra la inyección consecutiva de sulfato de serotonina (5-HT) por vía sistémica estimula la

acumulación de la amina en la hipófisis y en el ovario, y que además este evento está relacionado con la disminución en la concentración de gonadotropinas y de hormonas esteroideas sexuales (Gallegos, 2007; Romero, 2009). El bloqueo de la recaptura de 5-HT en la hipófisis mediante la administración de cuatro dosis de FLX y el hecho de que la 5-HT también se sintetiza in situ quizás explique el incremento en la concentración de 5-HT.

En el ovario de la rata no se ha mostrado la presencia de la proteína SERT, mientras que en el ratón se ha observado que está distribuida en los ovocitos y células del complejo cumulus (Amireault y Dubé, 2005<sup>a, b</sup>; Dubé y Amireault, 2007). A diferencia del SNC, en los ovarios se expresa la isoforma TPH1 (Amireault y Dubé, 2005<sup>b</sup>), la cual tiene mayor afinidad por el Trp lo que resulta en el aumento de la biotransformación a 5-HT (McKinney y col., 2005). Estas evidencias nos permiten plantear que el incremento en la concentración de 5-HT que se observó en el ovario de los animales inyectados con FLX se deba a la acción directa del fármaco al inactivar a la SERT, la cual es blanco de la FLX (Wong y col., 2005) y al aumento en la biotransformación del Trp en 5-HT.

Una posible explicación a la falta de cambios en la concentración del 5-HIAA en ovario de los animales tratados con FLX es la inhibición de la enzima MAO-A ya que en SNC se ha observado que la FLX actúa como un inhibidor no competitivo de la misma (Fišar y col., 2010), lo cual se traduce en la disminución de la actividad de la enzima.

El mayor número de folículos primarios sanos (clase 1) que se observó en el ovario de los animales que recibieron el tratamiento agudo coincide con el incremento en la concentración de E<sub>2</sub> en suero y la presencia de folículos antrales sanos, que aunque no aumentaron en número, es en ellos en los cuales se sintetiza E<sub>2</sub>. Posiblemente el E<sub>2</sub> estimuló la proliferación de las células de la granulosa de los folículos primarios e incremento su número. Esta idea se basa en el hecho de que se ha observado la presencia de abundante ARNm y proteína de receptores a estrógenos en células de la granulosa de folículos en diferentes etapas de desarrollo (Chronowska 2012) y que es esencial para la proliferación y estratificación de estas células.

En el humano la exposición prenatal a FLX estimula la expresión del receptor a IGF-I en la placenta (Davidson y col., 2009) y en las células de la granulosa bovinas en cultivo, el IGF-I estimula la síntesis de E<sub>2</sub> además de la proliferación de estas células (Rawan y col., 2015). Así, otra probable explicación al incremento de la concentración de E<sub>2</sub> y al número de folículos sanos es el aumento en la expresión del receptor a IGF-I, que en los ovarios de los mamíferos estimula el crecimiento de los folículos primordiales (Ojeda y Skinner, 2006).

Según Lister y colaboradores (2009), el tratamiento con FLX en peces reduce la expresión del receptor a FSH, lo cual resulta en la disminución de la concentración de E<sub>2</sub>. En nuestro estudio, observamos el efecto opuesto. Estas diferencias posiblemente son el resultado de características específicas de cada especie, así como del tiempo de exposición al fármaco. Aunque no existe información del mecanismo de regulación por el cual la administración de FLX modula el proceso esteroidogénico. El incremento en la concentración de E<sub>2</sub> en los animales a los que se les inyectó una sola dosis de FLX y que fueron sacrificados 72h después, posiblemente está vinculada con la estimulación del receptor 5-HT<sub>2A</sub> y como resultado de una vía de señalización que culmina con la inducción de la expresión y actividad de la aromatasa, ya que en líneas celulares de coriocarcinoma humanas, el estímulo del receptor 5-HT<sub>2A</sub> con agonistas específicos incrementa la expresión de la aromatasa, así como su actividad catalítica (Klempan y col., 2011) y se sabe que este receptor está presente en las células de la granulosa del ratón y rata, tipo celular donde se transforma la T en E<sub>2</sub> (Amireault y Dube, 2005; Romero 2009).

En nuestro estudio se observó el retraso de la edad en la que se presentó el primer estro, es decir, la cornificación o queratinización de las células de la vagina, la cual depende de la actividad de los estrógenos (Miyagawa e Iguchi, 2015; Liang y col., 2015), posiblemente es el resultado de la acumulación gradual de NFLX (metabolito activo de la FLX) en este órgano. Lupu y colaboradores (2015) mostraron que en el medio donde se cultiva la línea celular de cáncer de mama T47D-Kbluc, la adición de NFLX resulta en el aumento de la actividad de los receptores a estrógenos y que este efecto se potencia con el incremento en la concentración de NFLX. Así, una posibilidad es que la NFLX se haya acumulado gradualmente en el epitelio vaginal con lo que se estimuló la actividad de los receptores a estrógenos presentes y la transformación de las células.

Morán y colaboradores (2012) mostraron que la inyección intraperitoneal de 5-HT disminuye la concentración de LH en suero, lo cual se acompaña de la disminución del número de animales ovulantes. Los autores postulan que este efecto es el resultado de que la 5-HT en la hipófisis inhibe la secreción de LH, lo cual se reflejó en la disminución del número de ovocitos liberados. En contraste, en nuestro estudio no observamos la disminución de la concentración de LH, pero sí menor el número de ovocitos liberados por los animales tratados con FLX. Una posibilidad es que la 5-HT estimuló la contracción de los vasos sanguíneos que ingresan al ovario y de esta forma se redujo el aporte de LH a la gónada. Ya que en la rata el estímulo de los receptores 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2B</sub> y 5-HT<sub>7</sub> distribuidos

en venas inducen la contracción de las mismas (Linder y col., 2010). También, algunas aminas biogénicas como la 5-HT modulan la respuesta del ovario a las gonadotropinas. Cuando en los ovarios de rata se elimina la inervación catecolaminérgica, el número de receptores a LH disminuye (Marchetti y col., 1987). Otra posibilidad es que el menor número de ovocitos liberados por los ovarios de los animales tratados con FLX es el resultado de que la 5-HT inhibe la expresión de los receptores a gonadotropinas, en particular los de la LH. Sin embargo, no existe información que muestre el posible mecanismo por el cual se lleve a cabo este evento.

En los ovarios de los animales tratados con FLX, sacrificados al primer estro se presentó mayor número de folículos de las clases 1, 2 y 3 además de que se alteró la estructura de los mismos. Estos resultados coinciden con lo reportado por Moore y colaboradores (2015) quienes mostraron que la administración perinatal de FLX estimula el incremento del número de folículos totales en el ovario de las crías en la edad adulta, y son particularmente los folículos preantrales y antrales los que se encuentran en mayor proporción, además de que presentan mayor número de células del folículo en apoptosis.

La 5-HT es un regulador de la proliferación celular y de la neurogénesis en la zona subgranular (SGZ) del giro dentado en el hipocampo de la rata adulta (Malberg y col., 2000), mientras que en el ovario no se tienen datos de sus efectos vinculados con estos procesos (proliferación y diferenciación celular). Sin embargo, una posible explicación al aumento en el número de los folículos de las clases 1, 2 y 3 puede ser el resultado de la inducción de la proliferación y diferenciación de células madre de la línea germinal (GSC, por sus siglas en inglés) por la acción de la 5-HT, cuya concentración fue mayor en el ovario de los animales tratados con FLX.

La idea de que en el ovario de la rata exista una población de células troncales (stem cells) capaces de desarrollarse en ovocitos, blanco de la acción de la 5-HT es apoyada por el hecho de que en los ovarios del ratón y ser humano se ha identificado la presencia de la proteína homóloga de ratón VASA (MVH por sus siglas en inglés), la cual se expresa principalmente en el núcleo y citoplasma de células germinales (Johnson y col., 2004; Noce y col., 2001), y cuya función es la de transportar y ensamblar ARNm durante la ovogénesis (Albamonte y col., 2008). Así mismo se sabe que la 5-HT induce la expresión de Bcl-2 en el ovario de la rata (Gallegos y col., 2007), gen que participa en la sobrevivencia celular y que también está presente en las células germinales del ovario de fetos humanos donde a su vez se expresa la proteína VASA (Albamonte y col., 2008). Posiblemente la 5-HT estimuló la

sobrevivencia de las células germinales al incrementar la expresión de Bcl-2, sin embargo, para el caso de la rata no se ha mostrado esta relación.

Otra de las formas mediante la cual la 5-HT posiblemente ejerce sus efectos sobre la proliferación y diferenciación celular en el ovario está relacionada con el tipo de receptor al cual se une, ya que se ha observado que cuando en ratones hembra adultas se estimulan los receptores a serotonina del tipo 5-HT<sub>1A</sub> en el SGZ del giro dentado se favorece la proliferación celular del área, mientras que cuando en esta zona se estimulan los receptores del tipo 5-HT<sub>2</sub> además de favorecer la proliferación se estimula la diferenciación celular (Klempin y col., 2010). En el caso de la rata se ha mostrado la presencia de los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1D</sub> y 5-HT<sub>2</sub> en el ovario (Tanaka y col., 1993; Bahena, 2009; Romero, 2009; Moore y col., 2015; Romero-Reyes y col., 2016).

Por otro lado, también se ha mostrado que en SNC la 5-HT induce la proliferación celular al incrementar la expresión del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF). Así mismo se ha observado que cuando ratones son inyectados intraperitonealmente con FLX, se incrementan los niveles de BDNF y la incorporación de BrdU en diferentes regiones del encéfalo (Hodes y col., 2010). El BDNF se ha detectado en el ovario de los mamíferos, particularmente en el ovocito y en células foliculares durante etapas tempranas del desarrollo folicular (Linher-Melville y Li, 2013). En los ratones se ha mostrado que la menor expresión de BDNF en los ovarios resulta en la disminución del número de ovocitos liberados (Wu y col., 2012), lo que concuerda con los animales tratados con FLX, sacrificados el día del primer estro vaginal.

En nuestro estudio observamos el incremento de la fragmentación de los ovocitos y la presencia de múltiples ovocitos en un mismo folículo de los animales tratados con FLX, así como mayor concentración de 5-HT en la gónada. Los efectos de esta amina en la proliferación celular en los ovarios de los mamíferos se desconocen, sin embargo, en otros tejidos, se sabe que la 5-HT induce la proliferación mediante la unión a sus propios receptores, tal es el caso del 5-HT<sub>1D</sub> (Cattaneo y col., 1994). El hecho de que no incrementara significativamente el ARNm para el receptor 5-HT<sub>1D</sub> el día del primer estro vaginal, probablemente como resultado de que el ARNm aumentó previamente al momento en el que se evaluó el mensajero y de que en el día del primer estro vaginal había una mayor cantidad de la proteína y no de ARNm, ya que existen genes que codifican para proteínas que se traducen a tasas muy bajas y cuya traducción se incrementa como respuesta a estímulos externos (Mata y col., 2005). Posiblemente la mayor concentración de 5-HT en el

ovario de los animales inyectados con FLX actuó como un estimulante para inducir la traducción del ARNm a proteína .para el receptor 5-HT<sub>1D</sub>.

En este estudio se mostró que la administración de FLX en la rata prepúber retrasa el inicio de la pubertad, provoca anormalidades en el crecimiento folicular y la ovulación. En el animal adulto la administración prolongada de FLX produce hiperprolactinemia, alarga la duración de las etapas del ciclo estral, entre otros efectos.

Dado que este fármaco se utiliza en pacientes prepúberes y púberes para el tratamiento de algunas patologías mentales. Sería importante considerar los potenciales efectos del uso de este tipo de medicamentos en edades tempranas sobre la salud reproductiva de los adultos.



## **Conclusiones**

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

- ∞ La 5-HT estimula la síntesis de  $E_2$  por el ovario y como resultado aumenta el número de folículos primarios sanos.
- ∞ El bloqueo sub-crónico de la recaptura de 5-HT retrasa la edad en que se presenta el primer estro vaginal.
- ∞ La inhibición sub-crónica de la recaptura de 5-HT resulta en un menor número de ovocitos liberados en el día del primer estro vaginal.
- ∞ En el ovario de la rata prepúber, el bloqueo sub-crónico de la recaptura de 5-HT incrementa la concentración de 5-HT.

## **Referencias**

- Abraham KI, Ieni JR, Meyerson LR. (1987). Purification and properties of a human plasma endogenous modulator for the platelet tricyclic binding/serotonin transport complex. *Biochimica et Biophysica Acta*, 923:8-21.
- Albamonte MS, Willis MA, Albamonte MI, Jensen F, Espinosa MB, Vitullo AD. (2008). The developing human ovary: immunohistochemical analysis of germ-cell-specific VASA protein, Bcl-2/Bax expression balance and apoptosis. *Human Reproduction*, 23(8): 1895–1901.
- 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. *The Anatomical Record*, 233: 478-484.
- Amireault P y Dubé F. (2005<sup>a</sup>). Intracellular cAMP and Calcium Signaling by Serotonin in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes. *Molecular Pharmacology*, 68:1678–1687.
- Amireault P y Dubé F. (2005<sup>b</sup>). Serotonin and Its Antidepressant-Sensitive Transport in Mouse Cumulus-Oocyte Complexes and Early Embryos. *Biology of Reproduction*, 73:358–365.
- Amsterdam A, Tajima K, Frajese V, Seger R. (2003). Analysis of signal transduction stimulated by gonadotropins in granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 202: 77-80.
- Andersen CY y Ezcurra D. (2014). Human steroidogenesis: implications for controlled ovarian stimulation with exogenous gonadotropins. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 12: 128.
- Aragón MA, Ayala ME, Marín M, Avilés A, Damián-Matsumura P, Domínguez R. (2005). Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development. *Reproduction*, 129 (6):717-27.
- Arias P, Szwarcfarb B, Rondina DC, Carbone S, Sverdlik R, Moguilevsky JA. (1990). In vivo and in vitro studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in prepubertal and peripubertal female rats. *Brain Research*, 523: 57-61.

- Bahena D. (2009). Efecto de la administración de agonistas de los receptores a serotonina 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> en bursa del ovario en la secreción de progesterona, testosterona y estradiol. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. pp 66.
- Barnes NM, Sharp T. (1999). A review of central 5-HT receptors and their function. *Neuropharmacology*, 38: 1083-1152.
- Battista PJ, Condon WA. (1986). Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow luteal cells *in vitro*. *Journal of Reproduction*, 76: 231-238.
- Battista PJ, Poff JP, Deaver DR, Condon WA. (1987). Biogenic amine regulation of bovine luteal progesterone production in vivo. *Journal of Reproduction and Fertility*, 80:517-522.
- Becú de Villalobos D, Lux VAR, Lacau de Mengido I, Libertun C. (1984). Sexual Differences in the Serotonergic Control of Prolactin and Luteinizing Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology*, 115(1): 84-89.
- Best J, Nijhout HF, Reed M. (2010). Serotonin synthesis, release and reuptake in terminals: a mathematical model. *Theoretical Biology and Medical Modelling*, 19:7-34.
- Blier P, Piñeyro G, el Mansari M, Bergeron R, de Montigny C. (1998). Role of somatodendritic 5-HT autoreceptors in modulating 5-HT neurotransmission. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 15; 861:204-16.
- Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. (1999). Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *PNAS*, 96(21): 12079–12084.
- Bódis J, Török A, Tinneberg HR, Hanf V, Harmori M, Cledon P. (1992). Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 57 (5): 1008-1011.
- Bogan R L, Niswender GD. (2007). Constitutive Steroidogenesis in Ovine Large Luteal Cells May Be Mediated by Tonically Active Protein Kinase A1. *Biology of Reproduction*, 77: 209–216.
- Bonnin A, Peng W, Hewlett W, Levitt P. (2006). Expression mapping of 5-HT<sub>1</sub> serotonin receptor subtypes during fetal and early postnatal mouse forebrain development. *Neuroscience*, 141 (2): 781–794.
- Carr GV y Lucki I. (2010). The role of serotonin receptor subtypes in treating depression: a review of animal studies. *Psychopharmacology*, 213(2-3):265-87

- Castro ME, Ayala ME, Monroy J, Chavira R, Damian-Matsumura P, Domínguez R. (2001). Changes in monoaminergic activity in the anterior, medium and posterior hypothalamus, gonadotropins levels and ovarian hormones during puberty of the female rat. *Brain research bulletin*. 1; 54(4):345-52.
- Cattaneo MG, Palazzi E, Bondiolotti G, Vicentini LM. (1994). 5-HT<sub>1D</sub> receptor type is involved in stimulation of cell proliferation by serotonin in human small cell lung carcinoma. *European journal of pharmacology*. 268:425-30.
- Chameau P, van Hooft JA. (2006). Serotonin 5-HT<sub>3</sub> receptors in the central nervous system. *Cell and tissue research*, 326:573–581.
- Chronowska E. (2012). Regulation of telomerase activity in ovarian granulosa cells. *Indian Journal of Experimental Biology*, 50: 595-601.
- Clausell DE, Soliman KFA. (1978). Ovarian serotonin content in relation to ovulation. *Experientia*, 34(3):410-1.
- Cortés OM. (2009). Efecto de la Administración de 5-Hidroxitriptofano en la Secreción de Progesterona, Testosterona y Estradiol en la Rata Hembra Prepúber. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. pp 62.
- Couse JF, Hewitt SC, y Korach KS. (2006). Steroid Receptors in the Ovary and Uterus. En: *The Physiology of Reproduction*. JD Neill (Eds). 3ra Ed. Raven Press, New York. pp 977-1016.
- Cruz G, Barra R, González D, Sotomayor-Zárate R, Lara HE. (2012). Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats. *Fertility and Sterility*, 98(5):1283-90.
- Dahlström A, Fuxe K. (1964). Localization of Monoamines in the Lower Brain Stem. *Experientia*, 15; 20(7):398-9.
- Davidson S, Prokonov D, Taler M, MAayan R, Harell D, Gil-ad I, Weizman A. (2009). Effect of Exposure to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors In Utero on Fetal Growth: Potential Role for the IGF-I and HPA Axes. *Pediatric Research*, 65 (2): 236-241.
- Descarries L y Riad M. (2012). Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT<sub>1A</sub> receptors and SERT. *Philosophical transactions of the royal society B*. 367, 2416–2425.
- Dubé F., Amireault P. (2007). Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos. *Life Sciences*, 81: 1627-1637.

- Dynarowicz I, Watkowski T, Dziegielewska M. (1988). Analysis of the effects of oxytocin, vasopressin, angiotensin, serotonin and histamine on the blood flow in the reproductive organs of swine during estrous cycle. *Polskie archiwum weterynaryjne*, 28(1-2):99-111.
- Eddie SL, Childs AJ, Kinnell HL, Brown P, Jabbour HN, Anderson RA. (2015). Prokineticin Ligands and Receptors Are Expressed in the Human Fetal Ovary and Regulate Germ Cell Expression of COX2. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 100(9):E1197-205.
- Emslie GJ, Kennard BD, Mayes TL, Nakonezny PA, Moore J, Jones JM, Foxwell AA, King J. (2015). Continued Effectiveness of Relapse Prevention Cognitive-Behavioral Therapy Following Fluoxetine Treatment in Youth With Major Depressive Disorder. *Journal of the American Academy of Child & Adolescent Psychiatry*, 54(12):991-8.
- Ercan ES, Kandulu R, Akyol Ardic U. (2012). Preschool children with obsessive-compulsive disorder and fluoxetine treatment. *European Child & Adolescent Psychiatry*, 21(3):169-72.
- Espey LL, Richards JS. (2006). Ovulation. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD Neill (Eds). 3ra Ed. Raven Press, New York. pp 425-474.
- Epifano O y Dean J. (2002). Genetic control of early folliculogenesis in mice. *TRENDS in Endocrinology & Metabolism*, 13:4, 169-173.
- Findlay JK, Drummond AE. (1999). Regulation of the FSH Receptor in the Ovary. *Trends in Endocrinology & Metabolism*, 16 (8): 368–373.
- Fišar Z, Hroudová J, Raboch J. (2010). Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers. *Neuroendocrinology Letters*, 31(5): 645–656.
- Flores A, Meléndez G, Palafox MT, Rodríguez JO, Barco AI, Chavira R, Domínguez R, Cruz ME. (2005). The participation of the cholinergic system in regulating progesterone secretion through the ovarian-adrenal crosstalk varies along the estrous cycle. *Endocrinology*, 28 (2):145-51.
- Gallegos E. (2007). Participación de la serotonina en los mecanismos que regulan el proceso de atresia y apoptosis en el ovario de la rata durante la etapa prepuberal. Tesis de Maestría, Maestro en Ciencias Biológicas, UNAM. pp 87.
- Gerasimov MR, Franceschi M, Volkow ND, Gifford A, Gatley SJ, Marsteller D, Molina PE, Dewey SL. (2000). Comparison between Intraperitoneal and Oral Methylphenidate Administration: A Microdialysis and Locomotor Activity Study. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 295:51–57.

- Glick AR. (2015). The role of serotonin in impulsive aggression, suicide, and homicide in adolescents and adults: a literature review. *International Journal of Adolescent Medicine and Health*, 27(2):143-50.
- Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. (2007). The Rodent Estrous Cycle: Characterization of Vaginal Cytology and Its Utility in Toxicological Studies. *Birth Defects Research (Part B)* 80:84–97.
- Gore-Langton RE, Amstrong DT. Follicular Steroidogenesis and its Control. (1988). En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD Neill (Eds). 1ra Ed. Raven Press, New York. pp 331-355.
- Gore-Langton RE, Dorrington JH. (1981). FSH Induction of Aromatase in Cultured Rat Granulosa Cells Measured by a Radiometric Assay. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 22: 135-151.
- Gorman JM y Kent JM. (1999). SSRIs and SNRIs: Broad Spectrum of Efficacy Beyond Major Depression. *The Journal of clinical psychiatry*, 60( 4):33-38.
- Gouveia EM, Rodrigues CF. (2004). Involvement of serotonin 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion. *Brain Research Bulletin*, 63: 243-251.
- Graveleau C, Paust HJ, Schmidt-Grimminger D, Mukhopadhyay AK. (2000). Presence of a 5-HT<sub>7</sub> Receptor Positively Coupled to Adenylate Cyclase Activation in Human Granulosa-Lutein Cells. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 85(3): 1277-1286.
- Grasa P, Ploutarchou P, Williams SA. (2015). Oocytes lacking O-glycans alter follicle development and increase fertility by increasing follicle FSH sensitivity, decreasing apoptosis, and modifying GDF9:BMP15 expression. *The FASEB Journal*, 29: 525-539.
- Halász B, Kiss J, Molnár J. (1989). Regulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) neuronal system: morphological aspects. *Journal of steroid biochemistry*, 33(4B):663-8.
- Hiemke C y Härtter S. (2000). Pharmacokinetics of selective serotonin reuptake inhibitors. *Pharmacology & Therapeutics*, 85: 11–28.
- Hannon J, Hoyer D. (2008). Molecular biology of 5-HT receptors. *Behavioural Brain Research*, 195: 198–213.
- Harsing LG. (2006). The Pharmacology of the Neurochemical Transmission in the Midbrain Raphe Nuclei of the Rat. *Current Neuropharmacology*, 4(4): 313-339.

- Hodes GE, Hill-Smith TE, Suckow RF, Cooper TB, Lucki I. (2010). Sex-Specific Effects of Chronic Fluoxetine Treatment on Neuroplasticity and Pharmacokinetics in Mice. *The journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 332(1): 266-273.
- Hoyer D, Hannon JP, Martin GR. (2002). Molecular, pharmacological and functional diversity of 5-HT receptors. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*, 71: 533-554.
- Hubbard C.I y Oxberry B. (1991). Follicular atresia. En: *Ultrastructure of the Ovary*. G Familiari, S Makabe y PM. Motta (Eds). Springer Science Business Media. New York. Pp 1-321.
- Hussein MR. (2005). Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Hum Reprod Update*, 11(2):162-77.
- Hutt KJ. (2015). The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. *Reproduction*, 149: R81-R89.
- Il'ková G, Reháč P, Veselá J, Cikos S, Fabian D, Czikková S, Koppel J. (2004). Serotonin localization and its functional significance during mouse preimplantation embryo development. *Zygote*, 12(3):205-13.
- Jaurio AV, Chedrese PJ, Li XM. (1989). The Influence of Ovarian Hormones on the Rat Oviductal and Uterine Concentration of Noradrenaline and 5-Hydroxytryptamine. *Neurochemical Research*, 14(9): 821-827.
- Johns MA, Azmitia EC, Krieger DT. (1982). Specific *in Vitro* Uptake of Serotonin by Cells in the Anterior Pituitary of the Rat. *Endocrinology*, 110 (3): 754-760.
- Johnson J, Canning J, Kaneko T, Pru JK, Tilly JL. (2004). Germline stem cells and follicular renewal in the postnatal mammalian ovary. *Nature*, 428: 145-150.
- Justo SN, Rossano GL, Szwarefarb B, Rubio MC, Moguilevsky JA. (1989). Effect of Serotonergic System on FSH Secretion in Male and Female Rats: Evidence for Stimulatory and Inhibitory Actions. *Neuroendocrinology*, 50: 382-386.
- Kang S, Kang K, Lee K, Back K. (2007). Characterization of tryptamine 5-hydroxylase and serotonin synthesis in rice plants. *Plant Cell Rep*, 26(11):2009-15.
- Kiss J, Halász. (1985). Demonstration of Serotonergic Axons Terminating on Luteinizing Hormone Releasing Hormone Neurons in the Preoptic Area of the Rat Using a Combination of Immunocytochemistry and High Resolution Autoradiography. *Neuroscience*, 14: 69-78.

- Klempan T, Hudon-Thibeault AA, Oufkir T, Vaillancourt C, Sanderson JT. (2011). Stimulation of serotonergic 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells. *Placenta*, 32(9):651-6.
- Klempin F, Babu H, De Pietri Tonelli D, Alarcon E, Fabel K, Kempermann G. (2010). Oppositional effects of serotonin receptors 5-HT<sub>1a</sub>, 2, and 2c in the regulation of adult hippocampal neurogenesis. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 3: 1-11.
- Koppan M, Bodis J, Verzar Z, Tinneberg HR, Torok A. (2004). Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system. *Endocrine*, 24(2):155-9.
- Krsmanovic LZ, Hu L, Leung PK, Feng H, Catt KJ. (2010). Pulsatile GnRH secretion: Roles of G protein-coupled receptors, second messengers and ion channels. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 314:158–163.
- Le Floc'h N, Otten W, Merlot E. (2010). Tryptophan metabolism, from nutrition to potential therapeutic applications. *Amino Acids*.
- Li R y Albertini DF. (2013). The road to maturation: somatic cell interaction and self-organization of the mammalian oocyte. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 14:141-152.
- Liang R, Knight K, Nolfi A, Abramowitch S, Moalli PA. (2015). Differential effects of selective estrogen receptor modulators on the vagina and its supportive tissues. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*, 23(2): 129-137.
- Lin JS, Anaclet C, Sergeeva OA, Haas HL. (2011). The waking brain: an update. *Cellular and Molecular Life Sciences*.
- Lin F, Fu YH, Han J, Shen M, Du CW, Li R, Ma XS, Liu HL. (2014). Changes in the expression of FoxO1 and death ligand genes during follicular atresia in porcine ovary. *Genetics and Molecular Research*, 13 (3): 6638-6645.
- Linder AE., Ni W., Diaz JL., Szasz T., Burnett R., Watts SW. (2007). Serotonin (5-HT) in veins: Not All in vain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343: 415-421.
- Linder AE, Gaskell GL, Szasz T, Thompson JM, Watts SW. (2010). Serotonin Receptors in Rat Jugular Vein: Presence and Involvement in the Contraction. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 334:116–123.



- Linher-Melville K, Li J. (2013). The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation. *Reproduction*. 145:R43-54.
- Liu SS, Li AY, Witt CM, Pérez de León AA. (2011). Immunohistological localization of serotonin in the CNS and feeding system of the stable fly *Stomoxys calcitrans* L. (Diptera: Muscidae). *Archives of Insect Biochemistry and Physiology*, 77(4): 199–219.
- Liu Y, Suzuki YJ, Day RM, Fanburg BL. (2004). Rho Kinase-Induced Nuclear Translocation of ERK1/ERK2 in Smooth Muscle Cell. *Circulation Research*, 95:579-586.
- Lupu D, Pop A, Cherfan J, Kiss B, Loghin F. (2015). In Vitro Modulation of Estrogen Receptor Activity by Norfluoxetine. *Clujul Medical*, 88 (3): 386-390.
- Lushchak VI. (2014). Dissection of the hormetic curve: analysis of components and mechanisms. *Dose-response : a publication of International Hormesis Society*. 12:466-79.
- MacGillivray L, Lagrou LM, Reynolds KB, Rosebush PI, Mazurek MF. (2010). Role of Serotonin Transporter Inhibition in the Regulation of Tryptophan Hydroxylase in Brainstem Raphe Nuclei: Time Course and Regional Specificity. *Neuroscience*, 171: 407–420.
- McKinney, J., Knappskog, P.M., and Haavik, J. (2005). Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase. *J Neurochem*, 92(2): 311-20.
- Malberg JE, Eisch AJ, Nestler EJ, Duman RS. (2000). Chronic Antidepressant Treatment Increases Neurogenesis in Adult Rat Hippocampus. *The Journal of Neuroscience*, 20(24):9104–9110.
- Manabe N, Goto Y, Matsuda-Minehata F, Inoue N, Maeda A, Sakamaki K, Miyano TJ. (2004). Regulation mechanism of selective atresia in porcine follicles: regulation of granulosa cell apoptosis during atresia. *The Journal of reproduction and development.*, 50(5):493-514.
- Mandrioli R, Forti GC, Raggi MA. (2006). Fluoxetine metabolism and pharmacological interactions: the role of cytochrome p450, 7(2):127-33.
- Marchetti, B., Cioni, M., Badr, M., Follea, N., and Pelletier, G. (1987) Ovarian adrenergic nerves directly participate in the control of luteinizing hormone-releasing hormone and beta-adrenergic receptors during puberty: a biochemical and autoradiographic study. *Endocrinology*, 121(1): 219-26.
- Mata J, Marguerat S, Bähler J. (2005). Post-transcriptional control of gene expression: a genome-wide perspective. *TRENDS in Biochemical Sciences*, 30(9): 506-514.

- Matos-Feijó F, Casaccia-Bertoluci M, Reis C. (2011). Serotonin and hypothalamic control of hunger: a review. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 57(1):74-77.
- Matuszczyk JV, Larsson K, Eriksson E. (1998). Subchronic Administration of Fluoxetine Impairs Estrous Behavior in Intact Female Rats. *Neuropsychopharmacology*, (19):6, 492-498.
- Miller WL y Bose HS. (2011). Early steps in steroidogenesis: intracellular cholesterol trafficking. *Journal of Lipid Research*, (52), 2011-2135.
- Miyagawa S, Iguchi T. (2015). Epithelial estrogen receptor 1 intrinsically mediates squamous differentiation in the mouse vagina. *PNAS*, 112 (42): 12986–12991. .
- Moguilevsky JA, Wuttke W. (2001). Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Experimental and clinical endocrinology & diabetes*,109(4):188-95.
- Moore CJ, DeLong NE, Chan KA, Holloway AC, Petrik JJ, Sloboda DM. (2015). Perinatal Administration of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Induces Impairments in Reproductive Function and Follicular Dynamics in Female Rat Offspring. *Reproductive Sciences*, 1-15.
- Moran MJ, Ayala ME, Gallegos E, Romero J, Chavira R, Damián-Matsumura P, Domínguez R. (2012). Effects of systemic administration or intrabursal injection of serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in rats. *Reproduction, Fertility and Development*, 25(8):1105-14.
- Neilson L, Andalibi A, Kang D, Coutifaris C, Strauss JF III, Stanton JAL, Green DPL. (2000). Molecular Phenotype of the Human Oocyte by PCR–SAGE. *Genomics*, 63: 13–24.
- Nguyen T, Lee S, Hatzirodos N, Hummitzsch K, Sullivan TR, Rodgers RJ, Irving-Rodgers HF. (2012). Spatial differences within the membrana granulosa in the expression of focimatrix and steroidogenic capacity. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 363: 62–73.
- Noce T, Okamoto-Ito S, Tsunekawa, N. (2001). Vasa homolog genes in mammalian germ cell development. *Cell Structure and Function*, 26: 131–136 .
- Nunez EA, Gershon MD, Silverman J. (1981). Uptake of 5-Hydroxytryptamine by Gonadotrophs of the Bat's Pituitary: A Combined Immunocytochemical Radioautographic Analysis. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 29(11): 1336-1346.
- Ojeda SR, Skinner MK. (2006). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD Neill (Eds). 3ra Ed. Raven Press, New York. pp 2061-2126.

- Ojeda SR, Urbanski HF. (1988). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD Neill (Eds). 2da Ed. Raven Press, New York. pp 1699-1737.
- Palermo R. (2007). Differential actions of FSH an LH during folliculogenesis. *Reproductive BioMedicine*, (15): 3. 326-337.
- Papageorgiou A, Deneff C. (2007). Estradiol induces expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT) 4, 5-HT5, and 5-HT6 receptor messenger ribonucleic acid in rat anterior pituitary cell aggregates and allows prolactin release via the 5-HT4 receptor. *Endocrinology*, 148(3):1384-95.
- Payette RF, Gershon MD, Nunez EA. (1985). Serotonergic Elements of the Mammalian Pituitary. *Endocrinology*, 116(5): 1933-1941.
- Payette RF, Gershon MD, Nunez EA. (1987). Two types of secretory granules in gonadotrophs: discrimination by the simultaneous EM immunocytochemical localization of serotonin and beta-follicle stimulating hormone. *The Anatomical Records*, 219(4):394-401.
- Peluso JJ y Steger RW. (1978). Role of FSH in regulating granulosa cell division and follicular atresia in rats. *Journal of Reproduction and Fertility*, 54:275-278.
- Picut CA, Dixon D, Simons ML, Stump DG, Parker GA, Remick AK. (2014). Postnatal Ovary Development in the Rat: Morphologic Study and Correlation of Morphology to Neuroendocrine Parameters. *Toxicologic Pathology*, 43: 343-353.
- Plant TM. (2015). Neuroendocrine control of the onset of puberty. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 38: 73–88.
- Pronina TS, Kalas A, Ugrumov MV. (2010). Effect of Serotonin on the Formation of Neurons Producing Gonadotropin-Releasing Hormone in Wistar Rats. *Cell Differentiation and Proliferation*, 41(1):41-45.
- Qu Y, Aluisio L, Lord B, Boggs J, Hoey K, Mazur C. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: Increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex. *Pharmacology, biochemistry, and behavior*.92:469-73.
- Quirk PL, Siegel RE. (2005). The serotonin type 3A receptor facilitates luteinizing hormone release and LHbeta promoter activity in immortalized pituitary gonadotropes. *Endocrine*, 27(1):37-43.
- Rajkovic A, Pangas SA, Matzuk MM. (2006). Follicular Development: Mouse, Sheep, and Human Models. En: *The Physiology of Reproduction*. JD Neill (Eds). 3ra Ed. Raven Press, New York. pp 977-1016.

- Rapport MM, Green AA, Page IH. (1948). Serum vasoconstrictor (serotonin) iv. Isolation and characterization. *The Journal of Biological Chemistry*, 176(3):1243-51.
- Rawan AF, Yoshioka S, Abe H, Acosta TJ. (2015). Insulin-Like Growth Factor-1 Regulates the Expression of Luteinizing Hormone Receptor and Steroid Production in Bovine Granulosa Cells. *Reproduction in Domestic Animals*, 50: 283–291.
- Robkera RL, Russella DL, Yoshiokab S, Chidanada Sharmaa S, Lydona JP, O'Malleya BW, Espeyb LL, Richards JS. (2000). Ovulation: a multi-gene, multi-step process. *Steroids* 65: 559–570
- Romero J. (2009). Efecto de la administración de antagonistas de los receptores a serotonina del tipo 5-HT<sub>2A</sub> y 5-HT<sub>2C</sub> en la bursa del ovario en la secreción de progesterona, testosterona y estradiol. Tesis Profesional. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM. pp 66.
- Romero-Reyes J, Cárdenas M, Damián-Matsumura P, Domínguez R, Ayala ME. (2015). Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions. *Reproductive Toxicology*, 59:80-88.
- Saland LC, Samora A, Sanchez P, Chavez G. (1993). Immunocytochemical Studies of Tryptophan Hydroxylase, Tyrosine Hydroxylase and Serotonin Innervation in the Aging Rat Neurointermediate Pituitary. *Experimental Neurology*, 121: 119-126.
- Samson WK, McCann SM, Chud L, Dudley CA, Moss RL. (1980). Intra- and extrahypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) distribution in the rat with special reference to mesencephalic sites which contain both LHRH and single neurons responsive to LHRH. *Neuroendocrinology*, 31(1):66-72.
- Sánchez C y Hyttel J. (1999). Comparison of the Effects of Antidepressants and Their Metabolites on Reuptake of Biogenic Amines and on Receptor Binding. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 19(4): 467-489.
- Schmidt G, Kannisto P, Owan C, Sjöberg NO. (1988). Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused *in vitro*? *Acta Physiol Scand*, 132: 251-256.
- Shalini S, Dorstyn L, Dawar S, Kumar S. (2015). Old, new and emerging functions of caspases. *Cell Death and Differentiation*, 22, 526–539.
- Shannon N.J, Moore K.E. (1987)a. Determination of the source of 5-hydroxytryptaminergic neuronal projections to the neural and intermediate lobes of the rat pituitary gland through the use of electrical stimulation and lesioning experiments. *Brain Research*, 416: 322-33.

- Shannon NJ, Moore KE. (1987)b. 5-Hydroxytryptamine is synthesized in neurons terminating in the neural and intermediate lobes of the rat pituitary gland. *Brain Research*, 402:287-292.
- Siddiqui A, Abu-Amara M, Aldairy C, Hagan JJ, Wilson C. (2004). 5-HT<sub>7</sub> receptor subtype as a mediator of the serotonergic regulation of luteinizing hormone release in the zona incerta. *European Journal of Pharmacology*, 491: 77-84.
- Silverman AJ, Jhamandas J, Renaud LP. (1987). Localization of Luteinizing Hormone-Releasing Hormone (LHRH) Neurons That Project to the Median Eminence. *The Journal of Neuroscience*, 7(8): 2312-2319.
- Smith CCT. (1996). Evidence for separate serotonin and catecholamine compartments in human platelets. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1291: 1-4.
- Smith MJ, Jennes L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction*, 122: 1-10.
- Sokka T, Hämäläinen T, Huhtaniemi L. (1992). Functional LH receptor appears in the neonatal rat ovary after changes in the alternative splicing pattern of the LH receptor Mrna. *Endocrinology*. 130(3):1738-40..
- Stocco DM y McPhaul MJ (2006). Physiology of Testicular Steroidogenesis. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y JD Neill (Eds). 3ra Ed. Raven Press, New York. pp 977-1016.
- Sümegi A. (2009). [Domino principle--monoamines in bottom-view]. *Neuropsychopharmacol Hung*, 11(3):149.
- Szabat E, Vanhalo S, Soinila S. (1998). The Ontogenic Appearance of Tyrosine Hydroxylase, Serotonin, Gamma-Aminobutyric Acid, Calcitonin Gene Related Peptide, Substance P, and Synaptophysin Immunoreactivity in Rat Pituitary Gland. *International journal of developmental neuroscience*, 16(6): 449-460.
- Talbot P, Schroeder PC. (1982). 5-Hydroxytryptamine causes contraction of smooth muscle cells in preovulatory hamster follicles. *Journal of experimental zoology*., 224(3):427-36.
- Tanaka E, Baba N, Toshida K, Suzuki K. (1993). Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptor. *Life Sciences*, 53: 563-570.

- Tillet Y. (1992). Serotonergic Projections From the Raphe Nuclei to the Preoptic Area in Sheep as Revealed by Immunohistochemistry and Retrograde Labeling. *The Journal of Comparative Neurology*, 320: 267-272.
- Tiwari M, Prasad S, Tripathi A, Pandey AN, Ali I, Singh AK, Shrivastav TG, Chaube SK. (2015). Apoptosis in mammalian oocytes: a review. *Apoptosis*, 20:1019–1025.
- Tripathi A, Chaube SK. (2012). High cytosolic free calcium level signals apoptosis through mitochondria-caspase mediated pathway in rat eggs cultured in vitro. *Apoptosis*, 17(5):439-48.
- Tsutsumi R y Webster NJG. (2009). GnRH Pulsatility, the Pituitary Response and Reproductive Dysfunction. *Endocrine Journal*, 56 (6): 729-737.
- Ugrumov MV, Proshlyakova EV, Saponova A. (1989). Development of the Hypothalamic 5-Hydroxytryptamine System During Ontogenesis in Rats: Uptake and Release of 5-Hydroxytryptamine in Vitro, *Neuroscience*, 32(I):127-131.
- Ugrumov MV, Taxi J, Mitskevichl M.S, Tramu G. (1986). Development of the Hypothalamic Serotonergic System During Ontogenesis in Rats. *Immunocytochemical and Radioautographic Study*, *Developmental Brain Research*, 30: 75-84.
- Ulrich U, Nowara I, Rossmannith WG. (1994). Serotonergic control of gonadotrophin and prolactin secretion in women. *Clinical Endocrinology*, 41(6):779-85.
- Uphousea L, Henslerc JG, Sarkara J, Grossieb B. (2006). Fluoxetine disrupts food intake and estrous cyclicity in Fischer female rats. *Brain Research (1072)*: 79 – 90.
- Vaswani M, Linda FK, Ramesh S. (2003). Role of selective serotonin reuptake inhibitors in psychiatric disorders: a comprehensive review. *Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry* ,27: 85– 102.
- Wada K, Hu L, Mores N, Navarro CE, Fuda H, Krsmanovic LZ, Catt KJ. (2006). Serotonin (5-HT) Receptor Subtypes Mediate Specific Modes of 5-HT-Induced Signaling and Regulation of Neurosecretion in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons. *Molecular Endocrinology*, 20(1):125–135.
- Wenthur CJ, Bennett MR., Lindsley CW. (2013). *Classics in Chemical Neuroscience: Fluoxetine (Prozac)*. American Chemical Society, 5: 14-23.
- Wilkinson M, Brown RE. (2015). *An introduction to neuroendocrinology*. 2da Ed. Cambridge University Press. Pp 1-460.

- Wong, D.T., Perry, K.W., and Bymaster, F.P. (2005). Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac). *Nat Rev Drug Discov* 4(9): 764-74.
- Wu LM, Hu MH, Tong XH, Han H, Shen N, Jin RT. (2012). Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential. *PLoS One*. 7:e52331.
- Veselá J, Reháček P, Mihalík J, Czikková S, Pokorný J, Koppel J. (2003). Expression of Serotonin Receptors in Mouse Oocytes and Preimplantation Embryos. *Physiological research*, 52: 223-228.
- Vialli M, Erspamer V. (1937) Ricerche sul secreto delle cellule enterocromaffini. IX Intorno alla natura chimica della sostanza specifica. *Boll. Soc. Med.-Chir. Pavia* 51, 1111–1116.
- Wilson CA, McDonald PG. (1974). Inhibitory effect of serotonin on ovulation in adult rats. *Journal of Endocrinology*, 60: 253-260.
- Yang MY, Rajamahendran R. (2000). Morphological and Biochemical Identification of Apoptosis in Small, Medium, and Large Bovine Follicles and the Effects of Follicle-Stimulating Hormone and Insulin-Like Growth Factor-I on Spontaneous Apoptosis in Cultured Bovine Granulosa Cells. *Biology of Reproduction*, 62: 1209–1217.
- Zatylny C, Durantou F, Boucaud-Camou E, Henry J. (2000). Evidence of 5-hydroxytryptamine synthesis in the follicles of *Sepia officinalis* and direct involvement in the control of egg-laying. *Molecular reproduction and development*, 55(2):182-8.

## Anexo

### 1.- Extracción de RNA por TRIzol®.

- Se obtuvieron los ovarios en condiciones estériles y se colocaron en tubos de polipropileno. Las muestras se guardaron a -70°C hasta su procesamiento. Se agregó 1 ml de TRIzol® (Life Technologies Invitrogen, Carlsbad, CA) por cada 50-100 mg de tejido y se homogeneizó completamente con un politron®. El volumen de la muestra no debe exceder de un 10% el volumen del reactivo.

### 1.2.-Separación de las Fases.

- Las muestras homogeneizadas se incubaron por 5 min a temperatura ambiente (TA) para permitir la disociación del complejo de nucleoproteínas.
- Se agregaron 200 µl de cloroformo por cada 1 ml de TRIzol® empleado y se agitó vigorosamente durante 15 seg. Se vertió el contenido en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml (nuevo y estéril).
- Se incubaron las muestras por tres 3 min a TA y se centrifugaron a 12000xg durante 15 min. Después de la centrifugación la mezcla se separó en una fase inferior roja (fenol/cloroformo), una interfase blanca (ADN/proteínas) y una fase superior incolora (acuosa) donde permanece el ARN.

### 1.3.-Precipitación del ARN.

- Se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo y estéril
- Se agregaron 500 µl de isopropanol para precipitar el ARN, las muestras se incubaron durante 24 horas a -20°C.
- Las muestras se centrifugaron a 12000xg por 20 min. El ARN precipitado forma una masa algodonosa en el fondo y a un lado del tubo.



#### **1.4.-Lavado del ARN.**

- Se decantó el líquido sobrenadante en un pedazo de papel absorbente. Se agregó 1ml de etanol al 75% en agua con Di-Etil-Pirocarbonato (DEPC) al 1% (Sigma Chemical, St Louis, USA). Se mezcló la muestra hasta que “voló el pellet”. Se centrifugó a 7500xg por 5 min.

#### **1.5.-Resuspensión del ARN.**

- Se decantó el líquido sobrenadante en papel absorbente y se dejó secar el exceso de líquido con el tubo hacia abajo por 10 min.
- Se resuspendió el ARN en 50 µl de agua estéril con DEPC, pipeteando repetidamente. Se guardó a -20°C o -70°C.

La concentración del RNA extraído se evaluó con el NanoDrop 2000 Spectrophotometer usando 1.5 µl del ARN resuspendido en agua con DEPC. Para determinar la integridad del ARN se hizo una electroforesis con un gel de agarosa al 1% en donde se colocó 1.5 µl del ARN más 2.2 µl de bromuro de etidio con el buffer de carga.

# *Anexo 2*



Corrigendum

Corrigendum to “Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions”  
[Reprod. Toxicol. 59 (2016) 80–88]



Jessica Romero-Reyes<sup>a</sup>, Mario Cárdenas<sup>b</sup>, Pablo Damián-Matsumura<sup>c</sup>,  
Roberto Domínguez<sup>a</sup>, María Elena Ayala<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> *Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de Pubertad, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Iztapalapa, CP 09230 México D.F., Mexico*

<sup>b</sup> *Laboratorio de Hormonas Proteicas, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, CP 14080 México D.F., Mexico*

<sup>c</sup> *Departamento de Biología de la Reproducción, UAM Iztapalapa, CP 09340 México D.F., Mexico*

There was a mistake in the ‘Acknowledgement’ section of this article. The correct acknowledgement is provided below:  
The authors thank Dr. Aragón MA for preparation of figures and micrographs. This work was supported by grant UNAM-DGPA-PAPIIT-IN223714. We want to thank for the support given to in the realization of this study to the Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

DOI of original article: <http://dx.doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.12.006>.

\* Corresponding author.

E-mail address: [marayalamx@yahoo.com.mx](mailto:marayalamx@yahoo.com.mx) (M.E. Ayala).



# Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions

Jessica Romero-Reyes<sup>a</sup>, Mario Cárdenas<sup>b</sup>, Pablo Damián-Matsumura<sup>c</sup>,  
Roberto Domínguez<sup>a</sup>, María Elena Ayala<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de Pubertad, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, Iztapalapa, CP 09230 México D.F., Mexico

<sup>b</sup> Laboratorio de Hormonas Proteicas, Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de Nutrición Salvador Zubirán, Tlalpan, CP 14080 México D.F., Mexico

<sup>c</sup> Departamento de Biología de la Reproducción, UAM Iztapalapa, CP 09340 México D.F., Mexico

## ARTICLE INFO

### Article history:

Received 2 December 2014

Received in revised form

27 November 2015

Accepted 24 December 2015

Available online 30 December 2015

### Keywords:

Fluoxetine

Serotonin

Ovary

Rat

Oocyte

Follicle development

## ABSTRACT

Fluoxetine (FLX), a selective serotonin reuptake inhibitor is an antidepressant in the treatment of mood disorders. Its impact on reproductive processes is incompletely known. The present study analyzed the reproductive effects of FLX in prepubertal female rats. Two experiments were conducted. First (acute administration), 30-day-old female rats were injected intraperitoneally with 5 mg/kg of fluoxetine-hydrochloride, and were terminated 24, 48 or 72 h after the treatment. Second (subchronic administration), FLX was injected on days 30–33 of age, and the animals were terminated the day of first estrus. In acute treatment estradiol concentration increased to 72 h. In subchronic treatment increased serotonin concentration in ovaries and decreased the number of ova shed. An increase in number of atretic follicles and oocyte fragmentation was observed in these animals. The results suggest that FLX acts on the ovary or hypothalamus–pituitary axis resulting in modifications of the follicular development and ovulation.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

## 1. Introduction

5-Hydroxytryptamine (5-HT) is a biogenic amine that participates in the regulation of the hypothalamus–pituitary–ovary axis. This amine is synthesised from the essential amino acid L-tryptophan by the action of tryptophan hydroxylase (TPH) and is metabolized by monoamine oxidase (MAO) to 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5HIAA). These enzymes are the rate-limiting steps in the pathways of 5-HT synthesis and metabolism, respectively. 5-HT acts via 5-HT receptors, which are divided into classes 5-HT1 to 5-HT7 and are further subdivided into subtypes that range from A to F [1]. The serotonergic receptors have an extensive distribution in the body, including the reproductive axis [2–6].

Within the central nervous system (CNS), the major sources of 5-HT are the neurons located in the raphe nuclei, which send serotonergic fibres to various regions, including the hypothalamus [2]. In the hypothalamus, 5-HT participates in the modulation of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion [5]. In turn,

GnRH stimulates the secretion of the gonadotropins, follicle-stimulating hormone (FSH) and luteinising hormone (LH), by the pituitary. The binding of 5-HT to the 5-HT2 receptor stimulates the secretion of GnRH and FSH, while LH secretion is modified when the 5-HT1 and 5-HT2 receptors are activated [6].

Additionally, the serotonergic system in the pituitary is associated with gonadotropin secretion. In some mammals, the gonadotrophs exhibit granules formed from 5-HT and FSH or 5-HT and LH [5]. Furthermore, these cells show the capacity for 5-HT reuptake [7].

The potential involvement of 5-HT in the regulation of the reproductive axis is not limited to the regulation of the hypothalamic or pituitary function. 5-HT has been detected in the ovaries, oviducts and uterus [8]. In the ovaries of mice, Amireault and Dube [4] identified a serotonergic system that includes TPH, MAO, and the serotonin transporter protein, SERT, along with 5-HTD1 [9] and 5-HT7 in the oocytes. In addition, 5-HT2A and 5-HT2B receptors were detected in cumulus cell complex [10].

Several findings in model species suggest an important role of 5-HT in the regulation of ovarian function. 5-HT levels fluctuate during the estrus cycle, with the highest levels occurring during the estrus stage, suggesting that the fluctuations in 5-HT are associated

\* Corresponding author.

E-mail address: [marayalamx@yahoo.com.mx](mailto:marayalamx@yahoo.com.mx) (M.E. Ayala).

with ovulation [11]. In bovine females, 5-HT is associated with the regulation of steroidogenesis. Culturing bovine corpus luteum due to the cells in presence of 5-HT increased progesterone (P4) secretion, perhaps due to the cells expressing serotonin receptor types 5-HT1 and 5-HT2 [12]. According to Moran et al. [13], in the rat 5-HT inhibits estradiol secretion and diminishes ovulation.

Also, during prepubertal development of female rats, 5-HT acts on the hypothalamus-hypophyseal-gonadal axis [13–16], and has been implicated in modulation of the secretion of GnRH, gonadotropins and steroid hormones that regulate the onset of puberty and ovarian functions. This idea is based on the observation that elimination of serotonergic innervation arising from the dorsal raphe nucleus in 30-day-old prepubertal female rats, delays the timing of puberty, modifies LH release and blocks ovulation on the day of the first vaginal estrus, and increases atresia in preovulatory follicles [17].

Several substances enhance or inhibit serotonergic activity, and are used in the treatment of psychological and physical disorders; among these is FLX, Prozac®, a selective serotonin-reuptake inhibitor (SSRI). The target of FLX is the SERT. Inhibition of SERT results in an increase in the extracellular 5-HT concentration, which increases the activity of the serotonergic system in various regions of the forebrain, including the hypothalamus [18]. FLX also acts as an antagonist of the 5-HT2 serotonin receptors [19]. FLX is prescribed in the treatment of mood disorders in the general population, including children and adolescents [20–22].

Relatively few studies have investigated the effects of FLX on reproductive functions in females, particularly in mammals. In contrast, there are reports of toxic effects of FLX in the hypothalamic–pituitary–gonadal axis in fish. In these organisms, exposure to FLX decreases egg production and is considered an endocrine disruptor [23].

In adult female rats of the Fischer strain with regular estrus cycles, chronic FLX administration lengthened the estrus cycle [24]. When the treatment was applied to rats of the Sprague Dawley strain, only 40% showed modifications of the estrus cycle [25]. The effect of FLX on the estrus cycle can be related to the modification of gonadal steroid hormone secretion because it has been shown that estrogens regulate changes in the vaginal epithelium during the estrus cycle stage.

Treatment of rats with FLX induces hyperprolactinaemia, anovulation and decreased serum concentrations of P4 and estradiol (E2) [26,27]. These findings suggest that FLX affects the serotonergic system of the hypothalamus, which results in the modification of LH and prolactin (PRL) secretion. Moore et al. [28] observed that female offspring have longer cycles after exposure to FLX *in utero* until weaning, with increased numbers of ovarian follicles and apoptotic ovarian cells. These results show that prolonged ingestion of FLX during pregnancy induces adverse effects on the sexual development of female rats and modifies some reproductive parameters. According to the authors' interpretation of the results, these effects may be related to changes in follicular development.

Based on the knowledge that 5-HT is involved in the modulation of secretion of hormones that regulate the sexual maturation and onset of puberty in female rats, it is possible that the onset of puberty and first ovulation can be vulnerable to changes in the activity of serotonergic system induced by the administration of the FLX. To our knowledge, no study has been conducted to analyze the effects of administration of FLX throughout the prepubertal period on sexual maturation and ovarian functions in rats. Therefore, the aim of present study was to analyze the effects of FLX administration in onset of puberty and ovarian functions in prepubertal rats. To accomplish this objective and following the paradigm of the hypothalamus–pituitary–gonad axis, we first analyze the effects of FLX on serotonergic system; then in circulating gonadotropins and sexual hormones; then in the onset of puberty,

the ovary structure and function; then 5-HT1D receptor expression. We showed that FLX administration induced an increase in 5-HT in the ovaries. This increase resulted in an alteration of the ovarian structure and a decrease in the number of ova shed. Thus, our study may provide new insight to the knowledge of possible consequences of FLX consumption during sexual maturation at the onset of puberty, on ovarian function and reproduction.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Animals

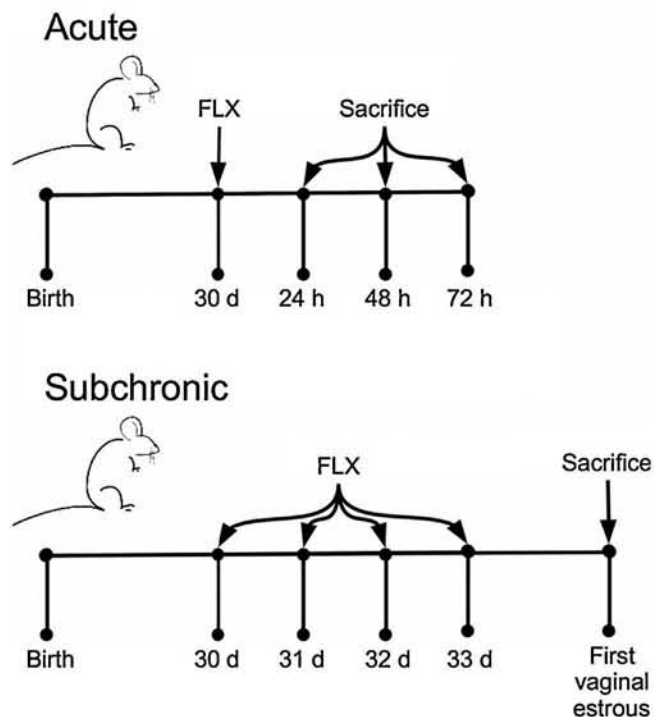
All experiments were performed following the guidelines established by the Mexican Law of Animal Protection Guidelines Treatment. The Committee of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, approved the experimental protocols (Letter 03/01/2012).

Four-month-old healthy pregnant rats of the CII-ZV conventional strain, no SPF, from our breeding stock, were housed individually in polycarbonate cages with bedding materials. These animals were maintained under standard room conditions, controlled temperature at 21 °C, humidity between 37% and 40%, with lights on from 05:00 to 19:00 h; with free access to food (Purina chow pellets, México) and water previously purified with filters. CII-ZV inbred strain is derived from Long–Evans and Wistar rats. CII-ZV strain was bred in the bioherium of the Facultad de Estudios Superiores Zaragoza (UNAM, México). This strain was characterized for various reproductive parameters, such as age of vaginal opening, age of first vaginal estrus, length of estrus cycle, litter size at birth, fecundity and litter size at parturition. These parameters are similar among CII-ZV, Long–Evans and Sprague–Dawley [29]. On postnatal day 1, the number and gender of live offspring of each dam was determined and the litter size was culled to 7 pups, comprised of six females and one male. The excess of offspring were donated to other experimental protocols. The pups had free access to their dams and were weaned at 21 days of age after which they had free access to food (Nutri-cubos, Purina S.A., México) and tap water. At postnatal day 30, females were randomly allocated into different experimental groups: Untouched, injected intraperitoneally with saline solution (0.9%) (Vehicle, VH) or with 5 mg/kg of fluoxetine hydrochloride (Sigma–Aldrich, St. Louis, USA), the minimum effective dose for the modification of the SERT protein in the CNS [30–32]. The animals were euthanized by carbon dioxide inhalation followed by being bled between 12:00 and 13:00 h.

At autopsy the pituitary, ovaries and brain were removed and placed in a cold saline solution. After removal from the brain, the anterior and medial hypothalami were sectioned following the parameters of the stereotaxic atlas of Paxinos [33]. The issues were stored at –70 °C until the 5-HT and 5-HIAA concentrations were measured using high-pressure liquid chromatography (HPLC) [34].

#### 2.1.1. Experiment 1: effects of acute administration of FLX on the serotonergic system in the hypothalamus–pituitary–ovarian axis and serum steroid levels

FLX is rapidly transformed to its major metabolite, norfluoxetine (NFLX), but the retention times for these drugs in the serum and particularly in tissues is long [32]. The prolonged retention extends the effects of the drug on 5-HT reuptake in the tissues. We also observed that variation of 5-HT concentration in ovaries was associated with modifications in steroid secretion [13]. Therefore, we decided to monitor the effects of a single dose of FLX on the levels of 5-HT and its metabolite, 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA), in the anterior and medial hypothalami, pituitary and ovaries and of progesterone (P4), testosterone (T) and 17 $\beta$ -estradiol (E2) in serum. Groups of rats of 30-days-old were injected



**Fig. 1.** Experimental timeline. Acute treatment; 30-day-old rats were injected with saline solution (VH) or fluoxetine (FLX) (one dose) and sacrificed 24, 48 or 72 h after treatment. Subchronic treatment; 30-day-old female rats received treatment with VH or FLX daily from the day 30 to 33 (four doses) and were terminated on the day of the first vaginal estrus.

intraperitoneally with a single dose of 5 mg/kg of FLX ( $n = 40$ ) or VH ( $n = 21$ ). An untreated control group ( $n = 23$ ) was also used. Animals were terminated 24, 48 or 72 h after the treatment (Fig. 1).

### 2.1.2. Experiment 2: effects of subchronic administration of FLX on puberty onset, the serotonergic system in the hypothalamus–pituitary–ovarian axis, ovulation and serum hormone levels

To determine whether FLX treatment induces changes in the onset of puberty, another group of rats was injected intraperitoneally daily with the same dose of FLX ( $n = 17$ ) used in the first experiment or VH ( $n = 14$ ), from 30-days-old until day 33 (Fig. 1). Also an untreated control group was included ( $n = 17$ ). The day of vaginal opening (puberty) was recorded and thereafter vaginal smears were taken daily between 10:00 and 11:00 h. The first estrus was identified by the presence predominantly of cornified epithelial cells in vaginal smears. The animals were euthanized by carbon dioxide inhalation followed by being bled on the day of first vaginal estrus. At autopsy, the oviducts were dissected, and the ova shed were removed and counted with the aid of a dissecting microscope. The ovulation rate was calculated with the following relationship: number of ovulating animals/number of treated animals.

### 2.2. Quantification of 5-HT and 5-HIAA

The tissue samples were weighed and homogenized in 0.1 N perchloric acid (150  $\mu$ l was used for the pituitary and 300  $\mu$ l for the hypothalamus and ovaries). The homogenates were centrifuged at 12,500 rpm for 30 min at  $-4^{\circ}\text{C}$ . The supernatant was filtered using 0.2- $\mu$ m regenerated cellulose filters. One hundred microliters of this extract was injected into the HPLC system (PerkinElmer Co., USA, Model LC-250). The concentrations of 5-HT and 5-HIAA were quantified electrochemically, using a LC-4C amperometric detector and an LC-4A glassy carbon transducer cell at a potential of 850 mV.

The mobile phase consisted of previously filtered and degassed 0.1 M citrate buffer (pH 3.0) with 175 mg of 1-octane sulfonic acid. Twenty millilitres of acetonitrile and 21.5 ml of tetrahydrofuran were added. The system was calibrated with a standard curve obtained by injecting stock solutions with concentrations ranging from 0.1 to 1 ng/ml, which were prepared in perchloric acid on the day of the experiment. The amine and its metabolite were identified by the retention times compared to the standards, and the 5-HT and 5-HIAA concentrations were determined by comparing the ratios of the peak heights of the unknown samples with those of their respective standards. The results are expressed as nanograms of neurotransmitter per milligram of tissue (ng/mg).

### 2.3. Analysis of the serum concentrations of FSH, LH, P4, T and E2

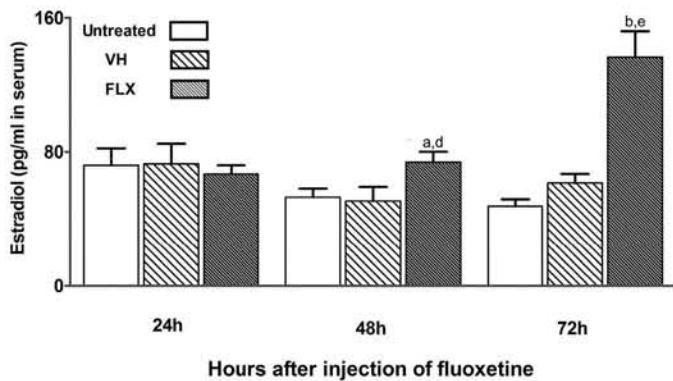
After decapitation, blood from the trunk was collected, held at room temperature for 20 min and centrifuged at 3500 rpm for 15 min. The serum was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$ , until the FSH, LH, P4, T and E2 concentrations were measured. FSH and LH were measured by radioimmunoassay (RIA) using a double-antibody technique, with the protocol and reagents supplied by the National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). The results are expressed as ng/ml relative to the reference preparations NIH LH-RP2 and FSH-RP2. The intra- and interassay coefficients of variation were 5.74 and 7.9% for FSH and 6.82 and 9.32% for LH, respectively. The steroids were measured using enzyme-linked immunoassays (ELISAs) with kits provided by AccuBind (Monobind Inc., Lake Forest, CA, USA). The sensitivities of each assay were as follows: P4, 0.105 ng/ml; T, 0.038 ng/ml; and E2, 6.5 pg/ml [35].

### 2.4. Analysis of the follicular population

The ovaries of the animals euthanized on the day of the first vaginal estrus were fixed in Bouin's fluid for 24 h, after which they were sequentially placed in ethanol 70% (180 min), 96% (90 min) 100% (90 min) and chloroform for 2 h. The tissues were then embedded in paraffin for 1 h and sectioned serially at 10  $\mu$ m. The sections were mounted on slides coated with albumin and stained with haematoxylin–eosin following the methodology described by Osman [36]. The follicular population was analyzed, and the follicles were classified into five categories based on their mean diameters: Class 1:  $<100 \mu\text{m}$ , Class 2: 101–199  $\mu\text{m}$ , Class 3: 200–349  $\mu\text{m}$ , Class 4: 350–499  $\mu\text{m}$  and Class 5:  $>500 \mu\text{m}$ . Only follicles with well-defined nuclei and nucleoli were included. Another parameter studied was the percentage of atretic follicles: atretic follicles were taken as those presenting pyknosis of granulosa cells, ovocyte abnormalities, desquamation of the granulosa cells into the follicular antrum and thickening of the theca cells [37].

### 2.5. Detection of expression of the 5-HT1D receptor by reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)

The ovaries were kept at  $-70^{\circ}\text{C}$  until mRNA isolation. The mRNA from three ovaries was isolated according to the TRIzol<sup>®</sup> protocol using sterile polyethylene tubes. The mRNA was reverse transcribed using an RT-PCR System (GeneAmp<sup>®</sup>, USA) in a 5- $\mu$ l reaction volume at  $42^{\circ}\text{C}$  for 15 min. The PCR analysis (25  $\mu$ l) consisted of 35 cycles of denaturation for 30 s at  $95^{\circ}\text{C}$ , primer annealing for 30 s at  $59^{\circ}\text{C}$  and primer extension for 30 s at  $72^{\circ}\text{C}$ . For  $\beta$ -actin [38], the primers used to produce amplicons of 285 bp were forward 5'-CGGAACCGCTCATTGCC and reverse 5'-ACCCACTGTGCCATCTA. For 5-HT1D [39], the primers used to produce amplicons of 558 bp were forward 5'-TGACTGCCTGGTGAACACATCTCA and reverse 5'-ACAAGCGTTTCAGAGAGTCGTCT. Five microlitres of each reaction



**Fig. 2.** Effects of acute treatment on estradiol concentrations. Mean concentrations of estradiol ( $\pm$ SEM) in untreated control, vehicle (VH) or fluoxetine (FLX) groups. Rats were terminated 24, 48 or 72 h after treatment. a,  $p=0.015$ ; b,  $p=0.0001$  compared to untreated control group. d,  $p=0.033$ ; e,  $p=0.004$  compared to VH group.

was loaded onto an agarose gel and stained with ethidium bromide. Both strands of all PCR products were sequenced.

### 2.6. Statistical analysis

All data were analysed using GraphPad Prism software. 5-HT and its metabolite, the serum hormone concentrations and 5-HT1D receptor expression were analyzed using Student's *t*-test. The age of vaginal opening, first vaginal estrus, the number of ova shed, number of total follicles and atretic follicles were analyzed using the Mann–Whitney U-test. The ovulation rate was analysed using a Fisher exact probability test. All values are expressed as the means  $\pm$  S.E.M. A probability of less than 5% was considered significant.

## 3. Results

### 3.1. Experiment 1: effects of acute FLX administration on the serotonergic system in the hypothalamus–pituitary–ovarian axis and serum steroid levels

There were no differences in progesterone, testosterone and estradiol concentrations, in the serum of untreated control animals and those injected with VH (Table 1, Fig. 2).

In the FLX-treated animals and euthanized 24, 48 or 72 h later, treatment did not change the 5-HT and 5-HIAA concentrations in the anterior or medial hypothalamus, pituitary or ovaries (data not shown) and did not alter the serum P4 and T levels (Table 1). However, the E2 concentrations increased significantly in the animals terminated 48 or 72 h after FLX administration (Fig. 2).

### 3.2. Experiment 2: effects of subchronic administration of FLX on puberty onset, the serotonergic system in the hypothalamus–pituitary–ovarian axis, ovulation and serum hormone levels

#### 3.2.1. The serotonergic system in the hypothalamus–pituitary–ovarian axis

FLX exposure did not cause changes in the 5-HT and 5-HIAA concentrations in the anterior or medial hypothalamus when measured on the day of the first vaginal estrus. However, in the pituitary of the FLX-treated animals, the 5-HT concentrations were higher than those treated with VH ( $0.24 \pm 0.02$  vs.  $0.29 \pm 0.03$  ng/mg of tissue,  $p < 0.05$ ) while the 5-HIAA concentrations were lower ( $0.40 \pm 0.03$  vs.  $0.27 \pm 0.03$  ng/mg of tissue,  $p < 0.05$ ). In the ovaries of the animals injected with FLX, the concentrations of this amine

**Table 2**

Mean ( $\pm$ SEM) body weight (BW) (gr), ages of vaginal opening (VO) and first vaginal estrus (FVE) (days), ovulation rate (OR), concentration of follicular stimulant hormone (FSH), luteinizing hormone (LH), progesterone (P4) (ng/ml), testosterone (T) (pg/ml) and estradiol (E2) (pg/ml), in untreated control rats or with acute administration of vehicle (VH) or fluoxetine (FLX) and terminated on the day of the first vaginal estrus.

Parameters	Groups		
	Untreated (n = 17)	VH (n = 14)	FLX (n = 17)
BW	107.39 $\pm$ 3.57	101.99 $\pm$ 3.51	109.4 $\pm$ 3.15
VO	38.12 $\pm$ 0.45	38 $\pm$ 0.63	39 $\pm$ 0.67
FVE	39.11 $\pm$ 0.72	38.21 $\pm$ 0.71	41.3 $\pm$ 0.8 <sup>*</sup>
OR	17/17	12/14	14/17
FSH	4.59 $\pm$ 1.07	7.19 $\pm$ 1.73	4.44 $\pm$ 1.49
LH	0.22 $\pm$ 0.08	0.26 $\pm$ 0.07	0.30 $\pm$ 0.09
P4	18.61 $\pm$ 1.58	19.83 $\pm$ 2.25	20.2 $\pm$ 2.45
T	113 $\pm$ 11.03	90 $\pm$ 10	110 $\pm$ 10
E2	24.90 $\pm$ 2.07	30.04 $\pm$ 2.15	31.34 $\pm$ 1.98

and its metabolite were significantly greater than those treated with VH (Fig. 3).

### 3.2.2. Puberty onset, number of ova shed and serum hormonal levels

There were no differences in none of the parameters evaluated between untreated and VH groups (Table 2, Fig. 3).

FLX administration did not alter body weight or puberty onset. The ovulation rate was not modified (Table 2), but the number of ova shed by the ovulating FLX-treated rats were significantly lower than those untreated control animals or injected with VH (Fig. 3).

The serum concentrations of FSH, LH, P4, T and E2 were similar in the FLX-treated animals and untreated control animals or injected with VH (Table 2).

### 3.2.3. Follicular population analysis

In comparison with the untreated control group or VH group, the ovaries of the FLX-injected animals had increased numbers of total follicles in classes two (101–199  $\mu$ m) and three (200–349  $\mu$ m) (Fig. 4A), although there were no changes in the total number of follicles in classes 1, 4 or 5. However, the ovaries of the FLX-treated animals had increased the numbers of atretic follicles in classes one, two and three (Fig. 4B). Furthermore, structural abnormalities, including oocyte fragmentation and the presence of multiple oocytes in the same follicle, were observed in the follicles of the various classes (Fig. 5).

### 3.2.4. Expression of the 5-HT1D receptor

RT-PCR analysis revealed the presence of mRNA for the 5-HT1D receptor in the ovaries. FLX treatment did not alter 5-HT1D expression in the ovaries of the prepubertal rats (Fig. 6).

## 4. Discussion

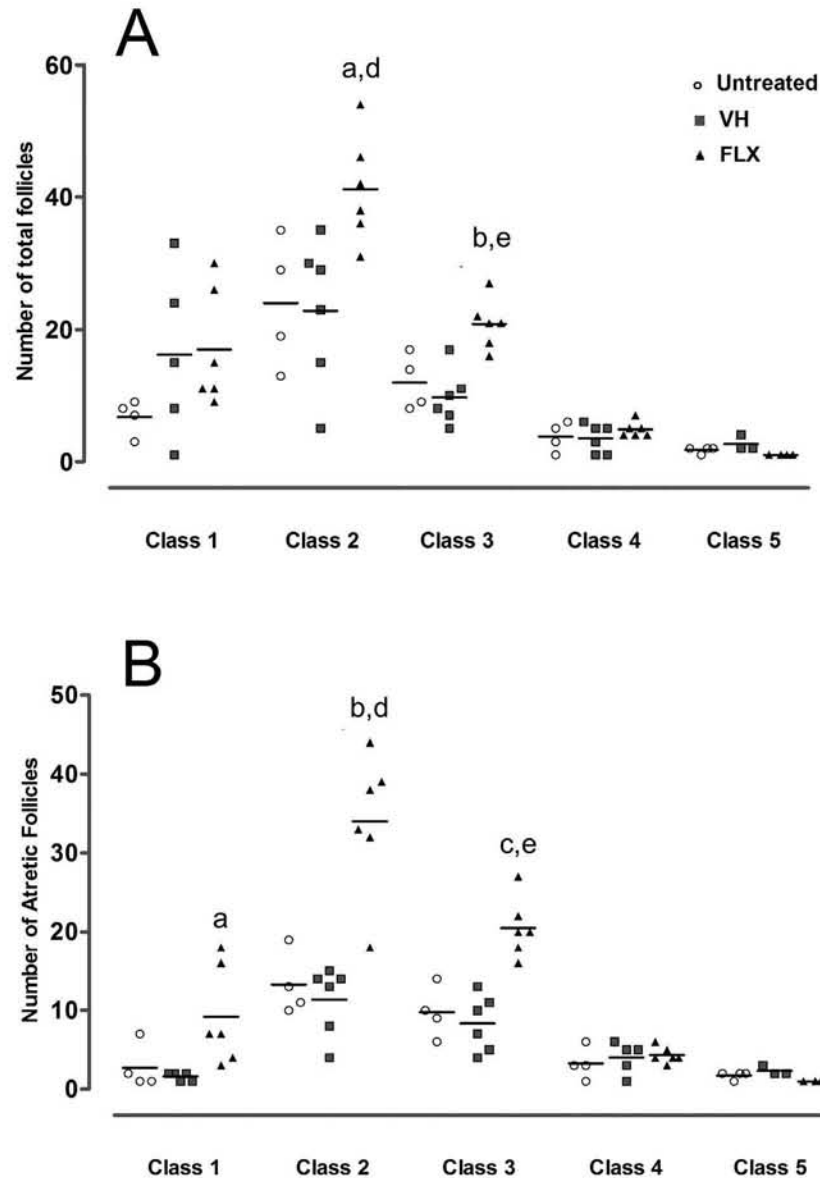
In this study we showed that treatment with FLX increased the levels of 5-HT in the ovaries, diminished the number of ova shed, and do not change the onset of puberty. At follicular level, the treatment with FLX increased number of small and medium follicles, and induced abnormalities in the oocytes of these follicles. These changes may be associated with the presence of the 5-HT1D receptor in the ovaries [9].

Vaginal opening, first vaginal estrus and first ovulation are endpoints for determining the onset of puberty [40]. In control animals the day of vaginal opening was accompanied by the presence predominantly of cornified cells in vaginal smears that characterize the first vaginal estrus and occurrence of the first ovulation. In FLX-treated animals the period between vaginal opening and the first vaginal estrus was two days. This event

**Table 1**

Mean ( $\pm$ SEM) of progesterone (P4) (ng/ml) and testosterone (T) (pg/ml), in serum of untreated control rats or with acute administration of vehicle (VH) or fluoxetine (FLX) and terminated 24, 48 or 72 h after the treatment.

	Untreated	VH	FLX	
24 h		(n = 10)	(n = 8)	(n = 10)
	P4	0.99 $\pm$ 0.36	1.0 $\pm$ 0.61	2.51 $\pm$ 0.64
	T	0.1 $\pm$ 0	0.11 $\pm$ 0.01	0.1 $\pm$ 0
48 h		(n = 10)	(n = 9)	(n = 16)
	P4	13.89 $\pm$ 3.13	14.6 $\pm$ 2.25	19.98 $\pm$ 2.47
	T	0.089 $\pm$ 0.009	0.13 $\pm$ 0.013	0.01 $\pm$ 0.002
72 h		(n = 8)	(n = 7)	(n = 14)
	P4	10.8 $\pm$ 3.44	12.5 $\pm$ 3.39	5.58 $\pm$ 0.98
	T	0.1 $\pm$ 0	0.1 $\pm$ 0	0.109 $\pm$ 0.009



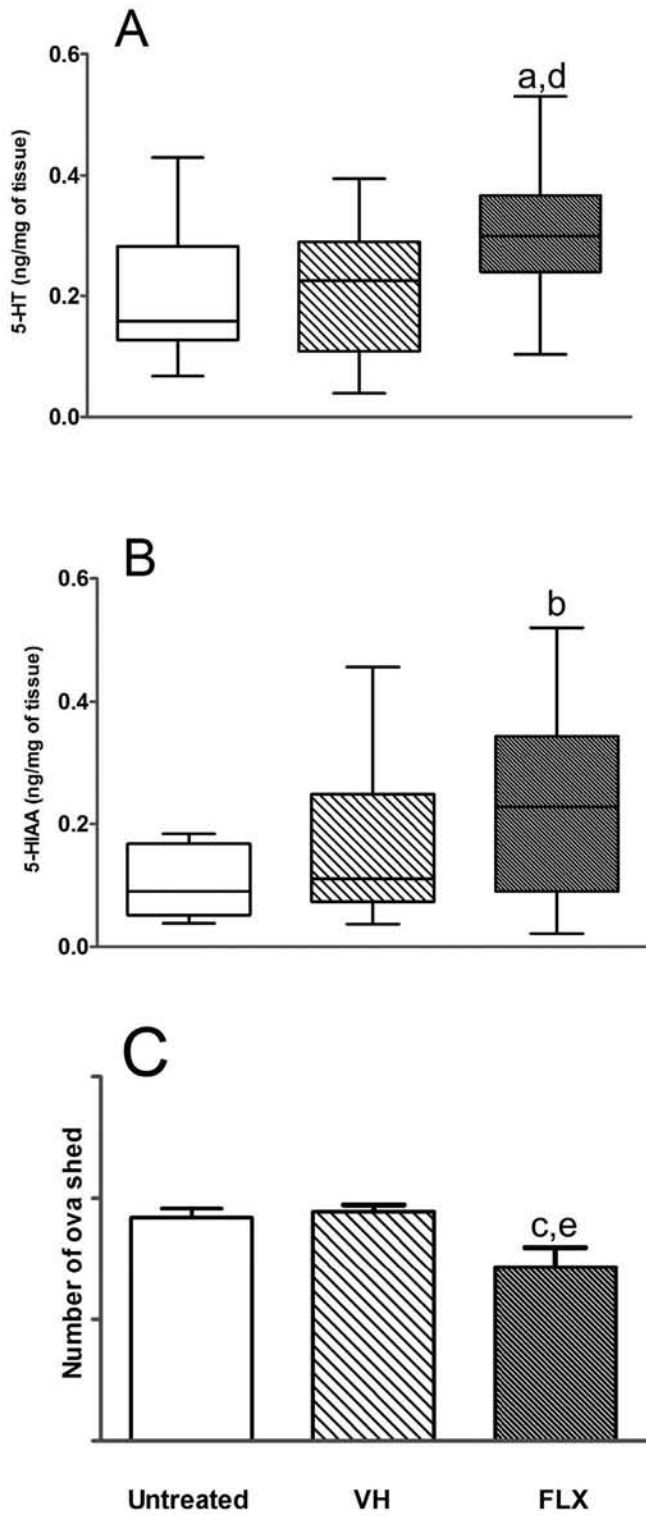
**Fig. 4.** Effects of subchronic treatment on distribution of total (A) and atretic follicles (B). Number of follicles; class 1 (<100  $\mu$ m), class 2 (101–199  $\mu$ m), class 3 (200–349  $\mu$ m), class 4 (350–399  $\mu$ m) and class 5 (>500  $\mu$ m) in untreated control, vehicle (VH) or fluoxetine (FLX) groups. Rats were terminated at the first vaginal estrus. a,  $p = 0.016$ ,  $p = 0.026$ ; b,  $p = 0.0085$ ,  $p = 0.0166$ ; c,  $p = 0.0017$  compared to untreated control group. d,  $p = 0.0085$ ; e,  $p = 0.007$ ,  $p = 0.0002$  compared to VH group.

could be related to delayed E2 secretion. This idea is supported because serum E2 levels increase to peak levels and activate the hypothalamic–pituitary–ovarian axis promoting the first ovulation

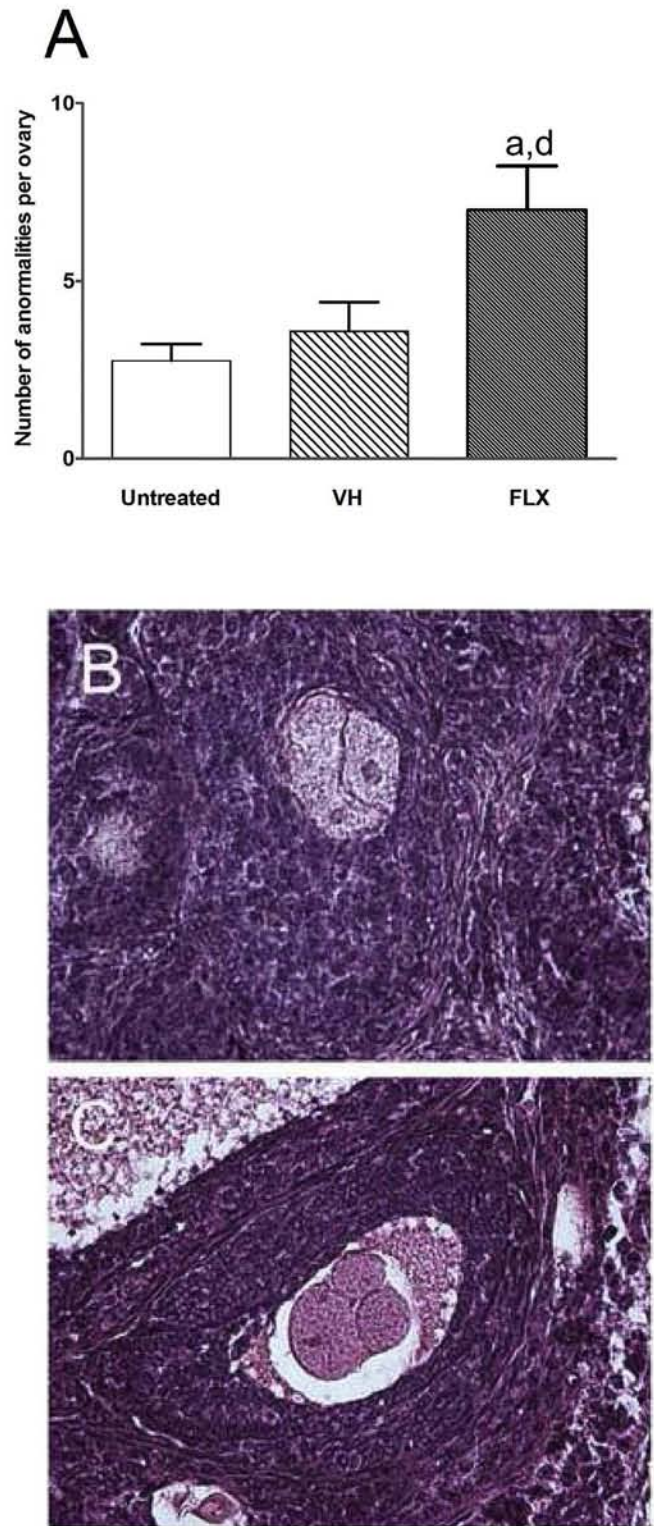
[41] and the stratification and cornification of the epithelium of the vagina [40].

Although acute FLX administration did not modify the 5-HT concentration in the hypothalamus–pituitary–ovarian axis, this

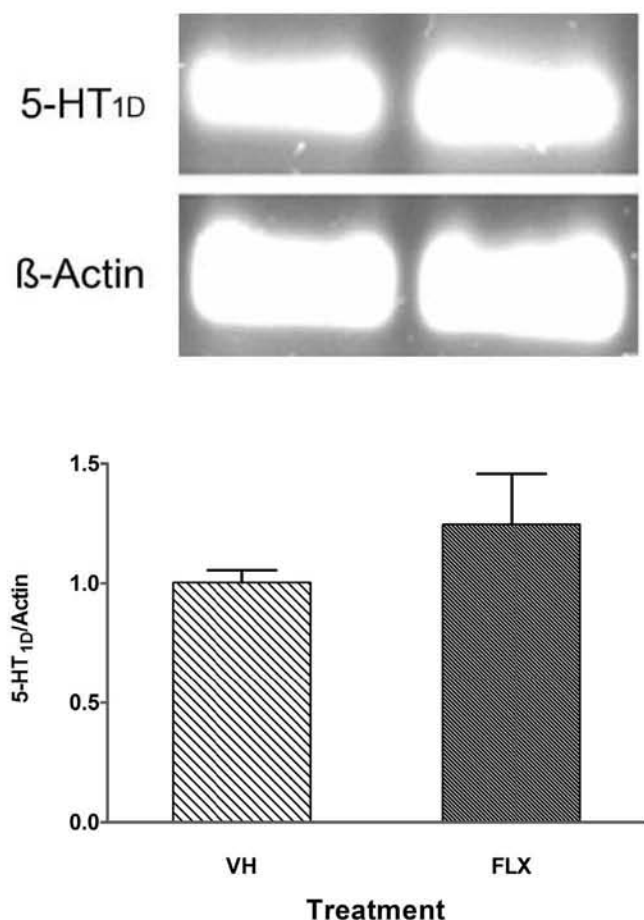




**Fig. 3.** Effects of subchronic treatment on 5-HT and 5-HIAA concentrations. Distribution of concentrations of 5-HT (A) or 5-HIAA (B) in untreated control, vehicle (VH) or fluoxetine (FLX) groups (horizontal bars in boxes are median values, boxes are 25–75% interquartile ranges, vertical lines indicate minimum and maximum values). (C) Number of ova shed (mean  $\pm$  SE) in untreated control, vehicle (VH) or fluoxetine (FLX) groups. Rats were terminated at the first vaginal estrus. a,  $p = 0.005$ ; b,  $p = 0.007$ ; c,  $p = 0.022$  compared to untreated control group. d,  $p = 0.018$ ; e,  $p = 0.017$  compared to VH group.



**Fig. 5.** Subchronic administration of FLX induces follicular abnormalities. FLX induced a significant number of abnormalities in follicles (A), such as oocyte fragmentation (B) or multiple oocytes (C). Micrographs were taken at 400 $\times$ . Rats were terminated at the first vaginal estrus. a,  $p = 0.017$  compared to untreated control group. d,  $p = 0.047$  compared to VH group.



**Fig. 6.** Effect of subchronic FLX-treatment on expression of the 5-HT<sub>1D</sub> receptor mRNA. RT-PCR for the 5-HT<sub>1D</sub> receptor and  $\beta$ -actin control measured in mRNA extracted from the ovaries of vehicle (VH) or fluoxetine (FLX) groups. Rats were terminated at the first vaginal estrus.

treatment did modify the E2 concentration in the animals terminated 48 and 72 h after treatment. This effect is related to stimulation off 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptors in granulosa cells [42] and initiation of a signalling pathway that culminates with the stimulation of aromatase expression [43], the enzyme that transform T to E<sub>2</sub>; thus in the acute treatment, 5-HT<sub>2A</sub> is activated and the concentration of estradiol increased. There is little information related to FLX and estradiol production; however, in fish treated with FLX decrease the expression of FSH receptor and concentration of E<sub>2</sub> [23]. In our study, we observed the opposite effect; these differences are likely the result of the specific characteristics of each species and time of exposure to FLX.

In the subchronic treatment, a desensitization of the 5-HT<sub>2A</sub> receptor could result in non-changes in estradiol levels. The desensitization of 5-HT<sub>2A</sub> receptor induced by repeated exposure to agonist or antidepressants has been previously suggest [44–46]. Also the differences in the sensibility of other serotonin receptors to acute and chronic treatment with SSRIs has been proposed previously [47]. However, in mammals there is currently no information regarding the mechanisms of regulation by which FLX modulates steroidogenesis.

The 5-HT concentrations in the hypothalamus of the FLX-injected animals terminated on the day of first vaginal estrus did not change. This lack of change could be result of a reduction in the biosynthesis of 5-HT in the dorsal raphe nucleus (DRN). It has been observed that FLX inhibits SERT activity and, as a result, reduces serotonin reuptake. However, this drug also diminishes the expres-

sion of TPH, the rate-limiting enzyme for 5-HT synthesis, in the DRN [48]. The DRN is the structure that has the major number of serotonergic neurons, whose projections extend to various areas of the brain, including the hypothalamus. The inhibition of this enzyme was observed in animals that were treated for 28 days with 5 mg/kg/day included in feed. Another possibility is that the transformation of L-tryptophan to 5-HT is not sufficient to increase the 5-HT concentration in the hypothalamus of the FLX-treated animals. This possibility is supported by the observation that the TPH2 isoform identified in the CNS has a low affinity for L-tryptophan [48,49].

The increased concentration of 5-HT observed in the pituitary of the FLX-treated animals and the decreased levels of its metabolite 5-HIAA are consistent with a preliminary report that showed that this drug inhibits 5-HT reuptake [7]. When the anterior pituitary of bats were incubated with FLX, the number of granules that contained 5-HT in the gonadotrophs increased, suggesting that these cells have the capacity for 5-HT reuptake [50].

It is possible that the increase in the concentration of 5-HT observed in the ovaries of the FLX-treated rats resulted from the direct inhibition of SERT, the target protein for FLX, in this organ [20]. In mice, SERT was detected in oocytes and cumulus cell complexes [4,10,42]. These results support the idea that the 5-HT accumulation in the ovaries is the result of the inhibition of SERT activity. Additionally, unlike the CNS, the ovaries express the TPH1 isoform, which has a high affinity for L-tryptophan and therefore increases the 5-HT concentration [51].

One possible explanation for the lack of changes in 5-HIAA levels in the ovaries of FLX-treated animals is associated with the FLX-mediated inhibition of MAO-A activity. In the CNS, it has been observed that FLX acts as non-competitive inhibitor of this enzyme [52].

In a previous study Moran et al. [13] showed that an intraperitoneal injection of 5-HT sulphate diminished the serum concentration of LH, which was accompanied by a decrease in the number of ovulating animals. This effect is likely to be the result of 5-HT-induced inhibition of LH release by the pituitary, which is reflected in a decrease in the number of ova shed. However, in our study, we did not observe a decrease in the gonadotropin concentrations on the day of vaginal estrus, but did observe a decrease in the number of ova shed by the FLX-treated animals.

The diminution in the number of ova shed possibly reflect a decrease in LH levels during the proestrus day preceding the vaginal opening. Then, possibly the alterations in gonadotropins release, induced by FLX, modify the follicular maturation before the first vaginal estrus day. Thus, a full understanding of the effect of FLX on gonadotropin secretion, in prepubertal female rats, awaits further study. It is known that some neurotransmitters can modulate the ovarian response to gonadotrophins. With respect to the results described above, it has been observed that when the ovaries of rats were deprived of catecholaminergic innervation, the number of LH receptors in the ovaries decreased [53]. Thus, one possible explanation for the lower number of ova shed by the ovaries of the FLX-treated rats could be that 5-HT affected the expression of the gonadotropin receptors, especially LH. However, there is insufficient information to confirm these possible mechanisms.

The FLX-treated animals demonstrated modifications in the ovarian structure that included increased numbers of small and medium follicles. Possibly these events are related with the 5-HT stimulus on the cellular proliferation in these ovarian follicles.

The increase of 5-HT in the ovaries of FLX-treated animals promotes the follicular development in the first stages of follicle growth, which is reflected in the rise in the number of small (class 2) and medium (class 3) follicles. These changes are consistent with previous data reported by other authors, who showed an increase in secondary follicle number after exposure of female rats to FLX in

utero [28]. In our study the increase of small and medium follicles and can be related with the inhibition of follicular development progression.

The mechanism underlying the increase of the number of preantral follicles in the ovaries of FLX-treated animals is not understood. However, it is possible that elevated 5-HT levels in the ovary can directly affect the response of granulosa cells to gonadotropins. Another possibility is that 5-HT modifies local production or action of intraovarian growth factors that modulate the growth, differentiation and survival of preantral follicles. In this regard, there is evidence that follicular growth is controlled by gonadotropins and locally produced factors, such as estradiol and insulin-like growth factor. Also, it has been shown that development of primary and secondary follicles is dependent of local regulators [54].

The observation that the 5-HT concentration was higher in the gonads of these animals provides a possible explanation for the increase in the follicle numbers in the ovaries of the FLX-treated animals. Specifically, it is known that 5-HT regulates the cellular proliferation in the sub-granular zone (SGZ) of the dentate gyrus of the hippocampus in the adult rat [55]. The pathway by which 5-HT induces proliferation in CNS may be through an increase in brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression. It was observed that when mice were injected intraperitoneally with FLX, BDNF levels increased in multiple brain regions; bromodeoxyuridine (BrdU) incorporation also increased [56]. BDNF has been detected in the ovaries of mammals, particularly in the oocytes and follicular cells during the early steps of the follicular development. In mice, it has also been shown that a decrease in the levels of BDNF in the ovaries diminishes the oocyte development potential [57].

In our study, we observed increased abnormalities of the oocytes in the ovaries of the FLX-treated animals and high 5-HT concentrations in the gonads. The effects of this amine on cell proliferation in the ovaries of mammals are unknown, but in other tissues, it is known that 5-HT can induce cell proliferation via action through its receptors, including 5-HT<sub>1D</sub> [58].

Thus, the manner in which 5-HT affects cellular proliferation in the ovary may be related to the receptor type to which it binds. It has been observed that stimulation of the receptor type 5-HT<sub>1A</sub> in the dentate gyrus of the SGZ of female rats stimulated cellular proliferation in that zone. In the same zone, stimulation of the type 5-HT<sub>2</sub> receptors promoted cellular differentiation and proliferation [55]. Pharmacological studies in rats have demonstrated the presence of 5-HT<sub>1</sub> and 5-HT<sub>2</sub> receptors in the ovaries [59]. Previously, various studies in mice identified a local serotonergic network in the ovaries [4–10]. In the present study, we used RT-PCR to show that the 5-HT<sub>1D</sub> receptor is also expressed in the rat ovaries and that its expression tended to increase after FLX injection. These results suggest that the 5-HT in this organ could be associated with the stimulation of cellular proliferation and the increased numbers of small and medium follicles. The absence of any changes in the concentrations of the gonadotropins or steroid hormones supports this interpretation.

Finally, according to Turner et al. [60], the pharmacokinetics of substances injected intraperitoneally by the oral route is similar. However, these routes of administration may affect differentially the levels, absorption and metabolism of FLX. The intraperitoneal injection permits a rapid absorption and distribution of drugs [60], as the FLX, which enters the portal vein and thus is metabolized to norfluoxetine in the liver [30]. Meanwhile, when the drug is administered orally, the gastrointestinal environments may limit its absorption. Then we think that we cannot generalize present result with the humans.

## 5. Conclusions

1. The sub-chronic administration of FLX induced increase in the concentration of 5-HT in the ovaries, affecting the onset of puberty, first ovulation, and follicular development.
2. 5-HT may acts locally in the ovary modulating the follicular development. It is important to clarify the components of the local serotonergic system present in rat ovaries, the pathways by which 5-HT can induce changes in follicular development, and the role of FLX in these events.
3. The effects of FLX cannot to extrapolate to human and are required more studies in superior species. However, it is important consider its potential effects on human health care because the mechanisms that are controlling the sexual maturation are conserved across the species, including the humans.

## Declaration of interests

All authors declare that they have no conflicts of interests.

## Authors' contributions

María Elena Ayala-Escobar devised the study and planned the experiments; Jessica Romero Reyes, Roberto Domínguez and Pablo G. Damían-Matsumura participated in the analysis and discussion of the results; Mario Cárdenas participated in measured hormones by RIA. Jessica Romero-Reyes and María Elena Ayala-Escobar prepared the initial draft of the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

The authors thank Dr. Aragón MA for preparation of figures and micrographs. This work was supported by grant UNAM-DGPA-PAPIIT-IN223714.

## References

- [1] J. Hannon, D. Hoyer, Molecular biology of 5-HT receptors, *Behav. Brain Res.* 195 (2008) 198–213.
- [2] A. Dahlstrom, K. Fuxe, Localization of monoamines in the lower brain stem, *Experientia* 20 (1964) 398–399.
- [3] R.F. Payette, M.D. Gershon, E.A. Nunez, Two types of secretory granules in gonadotrophs: discrimination by the simultaneous EM immunocytochemical localization of serotonin and beta-follicle stimulating hormone, *Anat. Rec.* 219 (1987) 394–401.
- [4] P. Amireault, F. Dube, Intracellular cAMP and calcium signaling by serotonin in mouse cumulus–oocyte complexes, *Mol. Pharmacol.* 68 (2005) 1678–1687.
- [5] K. Wada, L. Hu, N. Mores, C.E. Navarro, H. Fuda, L.Z. Krsmanovic, et al., Serotonin (5-HT) receptor subtypes mediate specific modes of 5-HT-induced signaling and regulation of neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons, *Mol. Endocrinol.* 20 (2006) 125–135.
- [6] E.M. Gouveia, C.R. Franci, Involvement of serotonin 5HT<sub>1</sub> and 5HT<sub>2</sub> receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion, *Brain Res. Bull.* 63 (2004) 243–251.
- [7] M.A. Johns, E.C. Azmitia, D.T. Krieger, Specific in vitro uptake of serotonin by cells in the anterior pituitary of the rat, *Endocrinology* 110 (1982) 754–760.
- [8] F. Amenta, J.A. Vega, A. Ricci, W.L. Collier, Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system, *Anat. Rec.* 233 (1992) 478–484.
- [9] J. Vesela, P. Rehak, J. Mihalik, S. Czikova, J. Pokorny, J. Koppel, Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos, *Physiol. Res./Acad. Sci. Bohemoslov.* 52 (2003) 223–228.
- [10] P. Amireault, F. Dube, Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus–oocyte complexes and early embryos, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 358–365.
- [11] D.E. Clauseell, K.F. Soliman, Ovarian serotonin content in relation to ovulation, *Experientia* 34 (1978) 410–411.
- [12] P.J. Battista, W.A. Condon, Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow luteal cells in vitro, *J. Reprod. Fertil.* 76 (1986) 231–238.
- [13] M.J. Moran, M.E. Ayala, E. Gallegos, J. Romero, R. Chavira, P. Damian-Matsumura, et al., Effects of systemic administration or intrabursal injection of serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in rats, *Reprod. Fertil. Dev.* 25 (2013) 1105–1114.

- [14] J.A. Moguilevsky, W. Wuttke, Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 (2001) 188–195.
- [15] P. Arias, B. Szwarcfarb, D.C. de Rondina, S. Carbone, R. Sverdlik, J.A. Moguilevsky, 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 Res.* 523 (1990) 57–61.
- [16] S.N. Justo, G.L. Rossano, B. Szwarcfarb, M.C. Rubio, J.A. Moguilevsky, Effect of serotonergic system on FSH secretion in male and female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions, *Neuroendocrinology* 50 (1989) 382–386.
- [17] M.E. Ayala, P. Rosas, R. Dominguez, Different effects of unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation, *Brain Res. Bull.* 34 (1994) 27–30.
- [18] D.T. Wong, K.W. Perry, F.P. Bymaster, Case history: the discovery of fluoxetine hydrochloride (Prozac), *Nat. Rev. Drug Discov.* 4 (2005) 764–774.
- [19] A. Laakso, E.P. Palvimäki, M. Kuoppamäki, E. Syvalahti, J. Hietala, Chronic citalopram and fluoxetine treatments upregulate 5-HT<sub>2c</sub> receptors in the rat choroid plexus, *Neuropsychopharmacology* 15 (1996) 143–151.
- [20] M. Hunter, R. Battersby, M.I. Whitehead, Relationships between psychological symptoms, somatic complaints and menopausal status, *Maturitas* 8 (1986) 217–228.
- [21] G.E. Hodes, T.E. Hill-Smith, R.F. Suckow, T.B. Cooper, I. Lucki, Sex-specific effects of chronic fluoxetine treatment on neuroplasticity and pharmacokinetics in mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 332 (2010) 266–273.
- [22] A. Blazquez, S. Mas, M.T. Plana, P. Gasso, I. Mendez, M. Torra, et al., Plasma fluoxetine concentrations and clinical improvement in an adolescent sample diagnosed with major depressive disorder, obsessive-compulsive disorder, or generalized anxiety disorder, *J. Clin. Psychopharmacol.* 34 (2014) 318–326.
- [23] A. Lister, C. Regan, J. Van Zwol, G. Van Der Kraak, Inhibition of egg production in zebrafish by fluoxetine and municipal effluents: a mechanistic evaluation, *Aquat. Toxicol.* 95 (2009) 320–329.
- [24] L. Uphouse, J.G. Hensler, J. Sarkar, B. Grossie, Fluoxetine disrupts food intake and estrous cyclicity in Fischer female rats, *Brain Res.* 1072 (2006) 79–90.
- [25] N. Maswood, J. Sarkar, L. Uphouse, Modest effects of repeated fluoxetine on estrous cyclicity and sexual behavior in Sprague Dawley female rats, *Brain Res.* 1245 (2008) 52–60.
- [26] C. Ficioglu, H.I. Tekin, P.F. Arioglu, I. Okar, A murine model of adenomyosis: the effects of hyperprolactinemia induced by fluoxetine hydrochloride, a selective serotonin reuptake inhibitor, on adenomyosis induction in Wistar albino rats, *Acta Eur. Fertil.* 26 (1995) 75–79.
- [27] M. Rehavi, G. Attali, I. Gil-Ad, A. Weizman, Suppression of serum gonadal steroids in rats by chronic treatment with dopamine and serotonin reuptake inhibitors, *Eur. Neuropsychopharmacol.* 10 (2000) 145–150.
- [28] C.J. Moore, N.E. DeLong, K.A. Chan, A.C. Holloway, J.J. Petrik, Perinatal administration of a selective reuptake inhibitor induces impairments in reproductive function and follicular dynamics in female rat offspring, *Reprod. Sci.* (2015) 1–15.
- [29] B.R. Clark, O. Price, Sexual maturation and fecundity of wild domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*), *J. Reprod. Fertil.* 63 (1981) 215–220.
- [30] S. Caccia, M. Cappi, C. Fracasso, S. Garattini, Influence of dose and route of administration on the kinetics of fluoxetine and its metabolite norfluoxetine in the rat, *Psychopharmacol. (Berl.)* 100 (1990) 509–514.
- [31] V. Bouet, A. Klomp, T. Freret, M. Wylezinska-Arridge, J. Lopez-Tremoleda, F. Dauphin, et al., Age-dependent effects of chronic fluoxetine treatment on the serotonergic system one week following treatment, *Psychopharmacol. (Berl.)* 221 (2012) 329–339.
- [32] Y. Qu, L. Aluisio, B. Lord, J. Boggs, K. Hoey, C. Mazur, et al., Pharmacokinetics and pharmacodynamics of norfluoxetine in rats: increasing extracellular serotonin level in the frontal cortex, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 92 (2009) 469–473.
- [33] G. Paxinos, C. Watson, *The rat brain, in: Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, San Diego, 2007.
- [34] J. Monroy, M.A.E. Ayala, R. Chavira, P. Damián-Matsumura, R. Domínguez, Comparative effects of injecting 5,6-dihydroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty, *Brain Res. Bull.* 60 (2003) 307–315.
- [35] G. Cruz, R. Barra, D. Gonzalez, R. Sotomayor-Zarate, H.E. Lara, Temporal window in which exposure to estradiol permanently modifies ovarian function causing polycystic ovary morphology in rats, *Fertil. Steril.* 98 (2012) 1283–1290.
- [36] P. Osman, Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat, *J. Reprod. Fertil.* 73 (1985) 261–270.
- [37] J.L. Tilly, J.K. Pru, B.R. Rueda, Apoptosis in ovarian development, function, and failure, in: P.C.K. Leung, E.Y. Adashi (Eds.), *The Ovary*, 2nd ed., Academic Press, San Diego, 2004, pp. 321–352.
- [38] A.V. Kulikov, V.S. Naumenko, I.P. Voronova, M.A. Tikhonova, N.K. Popova, Quantitative RT-PCR assay of 5-HT<sub>1A</sub> and 5-HT<sub>2A</sub> serotonin receptor mRNAs using genomic DNA as an external standard, *J. Neurosci. Methods* 141 (2005) 97–101.
- [39] E.A. Jennings, R.M. Ryan, M.J. Christie, Effects of sumatriptan on rat medullary dorsal horn neurons, *Pain* 111 (2004) 30–37.
- [40] T. Zemunic, M. Peruzovic, V. Capkun, L. Zekan, S. Tomic, K. Milkovic, Reproductive ability of pubertal male and female rats, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36 (2003) 871–877.
- [41] H.F. Urbanski, S.R. Ojeda, The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion, *Endocrinology* 117 (1985) 644–649.
- [42] F. Dube, P. Amireault, Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos, *Life Sci.* 81 (2007) 1627–1637.
- [43] T. Klempan, A.A. Hudon-Thibeault, T. Oufkir, C. Vaillancourt, J.T. Sanderson, Stimulation of serotonergic 5-HT<sub>2A</sub> receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells, *Placenta* 32 (2011) 651–656.
- [44] J.A. Gray, B.L. Roth, Paradoxical trafficking and regulation of 5-HT<sub>2A</sub> receptors by agonists and antagonists, *Brain Res. Bull.* 56 (2001) 441–451.
- [45] E. Saders-Bush, M. Breeding, K. Knoth, M. Tsutsumi, Sertraline-induced desensitization of the serotonin 5-HT<sub>2</sub> receptor transmembrane signaling system, *Psychopharmacology* 99 (1989) 64–69.
- [46] D. Van Oeckelen, W.H.M.L. Luyten, J.E. Leysen, 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptors and their atypical regulation properties, *Life Sci.* 72 (2003) 2429–2449.
- [47] C. Mombereau, T.L. Gur, J. Onksen, A.B. Julie, Differential effects of acute and repeated citalopram in mouse models of anxiety and depression, *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 13 (2010) 321–334.
- [48] L. MacGillivray, L.M. Lagrou, K.B. Reynolds, P.I. Rosebush, M.F. Mazurek, Role of serotonin transporter inhibition in the regulation of tryptophan hydroxylase in brainstem raphe nuclei: time course and regional specificity, *Neuroscience* 171 (2010) 407–420.
- [49] L.G. Harsing Jr., The pharmacology of the neurochemical transmission in the midbrain raphe nuclei of the rat, *Curr. Neuropharmacol.* 4 (2006) 313–339.
- [50] E.A. Nunez, M.D. Gershon, A.J. Silverman, Uptake of 5-hydroxytryptamine by gonadotrophs of the bat's pituitary: a combined immunocytochemical radioautographic analysis, *J. Histochem. Cytochem.* 29 (1981) 1336–1346.
- [51] J. McKinney, P.M. Knappskog, J. Haavik, Different properties of the central and peripheral forms of human tryptophan hydroxylase, *J. Neurochem.* 92 (2005) 311–320.
- [52] Z. Fisar, J. Hroudova, J. Raboch, Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers, *Neuro Endocrinol. Lett.* 31 (2010) 645–656.
- [53] B. Marchetti, M. Cioni, M. Badr, N. Follea, G. Pelletier, Ovarian adrenergic nerves directly participate in the control of luteinizing hormone-releasing hormone and beta-adrenergic receptors during puberty: a biochemical and autoradiographic study, *Endocrinology* 121 (1987) 219–226.
- [54] P. Montge, C. Bondy, Importance of the IGF-I system in early folliculogenesis, *Mol. Cell. Endocrinol.* 163 (2000) 89–93.
- [55] J.E. Malberg, A.J. Eisch, E.J. Nestler, R.S. Duman, Chronic antidepressant treatment increases neurogenesis in adult rat hippocampus, *J. Neurosci.* 20 (2000) 9104–9110.
- [56] K. Linher-Melville, J. Li, The roles of glial cell line-derived neurotrophic factor, brain-derived neurotrophic factor and nerve growth factor during the final stage of folliculogenesis: a focus on oocyte maturation, *Reproduction* 145 (2013) R43–R54.
- [57] L.M. Wu, M.H. Hu, X.H. Tong, H. Han, N. Shen, R.T. Jin, et al., Chronic unpredictable stress decreases expression of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) in mouse ovaries: relationship to oocytes developmental potential, *PLoS One* 7 (2012) e52331.
- [58] M.G. Cattaneo, E. Palazzi, G. Bondiolotti, L.M. Vicentini, 5-HT<sub>1D</sub> receptor type is involved in stimulation of cell proliferation by serotonin in human small cell lung carcinoma, *Eur. J. Pharmacol.* 268 (1994) 425–430.
- [59] E. Tanaka, N. Baba, K. Toshida, K. Suzuki, Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT<sub>2</sub> receptor, *Life Sci.* 53 (1993) 563–570.
- [60] P.V. Turner, T. Brabb, C. Pekow, M.A. Vasbinder, Administration of substances to laboratory animals: routes of administration and factors to consider, *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 50 (2011) 600–613.



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

## Campeche, Campeche

14 al 18 de agosto de 2016

Centro de Convenciones y Exposiciones Campeche XXI



# T E M A S

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

### Informes e inscripciones:

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

### Dudas y aclaraciones:

[smcf.congreso@gmail.com](mailto:smcf.congreso@gmail.com)

**Fecha límite para la  
recepción de trabajos:  
25 de abril de 2016**

COMITÉ ORGANIZADOR/  
MESA DIRECTIVA:



Dr. Miguel Ángel Morales Mendoza  
Presidente

Dr. Benjamín Florán Garduño  
Vicepresidente

Dr. Jesús Hernández Falcón  
Secretario

Dr. Rodolfo Delgado Lezama  
Tesorero

**SECTUR**  
GOBIERNO DEL ESTADO  
CAMPECHE 2015-2021



### SEDE:

**Centro de Convenciones y Exposiciones  
Campeche XXI**  
Av. Pedro Sainz de Baranda s/n  
Sector Fundadores Area Ah-Kim-Pech  
Col. Centro  
San Francisco Campeche  
Tel (981) 811-9140



## **La Fluoxetina Retrasa el Inicio de la Pubertad en la Rata Hembra**

**Romero-Reyes Jessica (estudiante de posgrado)**, Alemán-Flores Jessica, Ayala-Escobar María Elena, Aragón-Martínez Andrés, Domínguez Roberto. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. Laboratorio de Pubertad. FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM)

La *fluoxetina* (FLX) es uno de los inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina (ISRS) más utilizados para el tratamiento de la depresión en adolescentes. La administración aguda de FLX estimula el incremento en la concentración de estradiol (E<sub>2</sub>). Sin embargo, se desconocen sus efectos en parámetros reproductivos a largo plazo. En el presente estudio se analizaron los efectos de la administración subcrónica de FLX, en la concentración de gonadotropinas [(hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH)], de esteroides sexuales progesterona (P<sub>4</sub>) y estradiol (E<sub>2</sub>), así como en el inicio de la pubertad y estructura del ovario.

Ratas hembra de la cepa CII-ZV de 30 días de edad fueron inyectadas con 5 mg/kg de FLX o solución salina (VH) desde los 30 hasta los 37 días de edad vía intraperitoneal. Se registraron las edades de la apertura vaginal (EAV) y del primer estro vaginal (EPEV), momento en el cual los animales se autopsiaron. En el suero se evaluó la concentración sérica de FSH, LH, P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>. Así como la estructura del ovario.

En comparación con el grupo VH en los animales a los que se les inyectó FLX, se retrasó la EAV (43.39±1.02 vs. 39.09±0.44 (VH), p<0.05) y del EPEV (43.29 ± 1.02 vs 39.09±0.44 (VH), p<0.05), disminuyó la concentración de FSH (1.34±0.36 vs. 3.91±0.70 (VH), p<0.05). No se modificó la concentración de LH, P<sub>4</sub> y E<sub>2</sub>. En el ovario se incrementó el número de folículos primordiales, primarios, preovulatorios, así como la fragmentación del ovocito y la presencia de múltiples ovocitos en un mismo folículo.

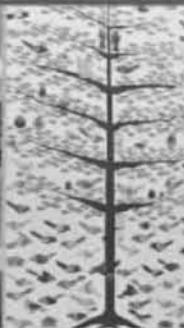
Los resultados generados en este estudio muestran que el bloqueo de la recaptura de serotonina retrasa el inicio de la pubertad y estimula la presencia de anomalías en el folículo ovárico de la rata prepúber.

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN223714



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

Agosto 31 al 4 de Septiembre, 2014, Oaxaca, Oaxaca



#### Temas:

Biofísica  
Biología celular y Bioquímica  
Cardiovascular y sistema muscular  
Desarrollo  
Endocrinología y Homeostasis  
Farmacología  
Genómica  
Inmunología y Hematología  
Métodos, técnicas e instrumentación  
Morfología  
Neurociencias  
Nutrición, metabolismo y obesidad  
Sueño y Ritmos biológicos  
Patología humana

#### Comité Organizador:

Dra. María Inés Uribe Urbán  
Presidente

Dr. Miguel Ángel Morales Menckza  
Vicepresidente

Dr. Daniel Ortúño Sahagún  
Secretario

Dr. Benjamín Flores García  
Tesorero

Boletines e inscripciones: [www.amcf.org.mx](http://www.amcf.org.mx)  
Dudas y aclaraciones: [amcf2014@hotmail.com](mailto:amcf2014@hotmail.com)



SEF





---

## Fluoxetina: Efecto Sobre las Funciones del Ovario en la Rata Prepúber

**Jessica Romero-Reyes<sup>1</sup> (estudiante de posgrado)**, María Elena Ayala-Escobar<sup>1</sup>, Pablo Gustavo Damián-Matzumura<sup>2</sup>, Roberto Domínguez<sup>1</sup>. 1. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. Laboratorio de Pubertad. FES Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); 2. Departamento de Biología de la Reproducción. Universidad Nacional Autónoma Metropolitana (UAM).

La fluoxetina (FLX) es un inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS), antagonista de los receptores serotoninérgicos, como el 5-HT<sub>1D</sub>. Se utiliza para tratar diferentes desordenes emocionales. Sin embargo, se desconocen sus efectos reproductivos, como las funciones del ovario. En el presente estudio se analizaron los efectos de la administración subcrónica de FLX en la ovulación, la concentración de serotonina (5-HT) y la expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub> en el ovario y de estradiol en el suero de la rata.

A ratas hembras de 30 días de edad se les inyectó diariamente 5 mg/kg de fluoxetina hidroclicorada vía intraperitoneal desde el día 30 hasta el 33. Como grupo de comparación se utilizaron animales a los que se les administró solución salina al 0.9 % (VH). Los animales se sacrificaron en el día del primer estro vaginal. Al momento de la autopsia se realizó la disección de los oviductos y se contó el número de ovocitos liberados. En el ovario izquierdo se cuantificó la concentración de 5-HT por cromatografía de líquidos de alta precisión y en el derecho se realizó el análisis de la expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub> por reacción inversa de la cadena de la polimerasa (RT-PCR) usando el kit RT-PCR System (GeneAmp®, USA). La concentración de estradiol se evaluó por ELISA.

En los animales tratados con FLX disminuyó el número de ovocitos liberados en el día del primer estro vaginal ( $7.0 \pm 0.8$  vs.  $9.5 \pm 0.3$ ,  $p < 0.05$ ) y en el ovario se incrementó la concentración de 5-HT ( $0.30 \pm 0.02$  vs  $0.22 \pm 0.02$ ,  $p < 0.05$ ), no se modificó la concentración de estradiol y se observó al tendencia al incremento en la expresión del receptor 5-HT<sub>1D</sub>.

Los resultados del presente estudio permiten sugerir que el bloqueo de la recaptura de serotonina en el ovario modifica sus funciones.

Trabajo apoyado por DGPA, PAPIIT-IN223714



# SSR 46<sup>th</sup> Annual Meeting

July 22 – 26, 2013

Palais des congrès de Montréal

Montréal, Québec

Hosted by the Réseau Québécois en reproduction

## Reproductive Health: Nano to Global PROGRAM



The *in vitro* culture of preantral follicles to obtain a large number of mature oocytes for *in vitro* fertilization has been the subject of intense research. The objective of this study was to compare the efficiency of an alginate three-dimensional *in vitro* culture system versus a two-dimensional *in vitro* culture system for the production of caprine mature oocytes from preantral follicles. Preantral follicles with a diameter of 150 to 250  $\mu\text{m}$  were isolated by microdissection and cultured for 18 days in microdrops directly on a plastic surface (2D) or encapsulated in an alginate-based matrix (3D). At the end of the culture period, the oocytes underwent *in vitro* maturation and fertilization to produce embryos. Discrete valuables obtained by counting, such as follicular viability, recovery rate and meiotic resumption were analyzed by dispersion of frequency using the Chi-square test, and the results were expressed as percentages. Hormone assays were assessed using the Kruskal-Wallis test. Compared to the 2D culture system, the 3D alginate system showed higher rates ( $P < 0.05$ ) of follicle survival after 18 days of culture (2D culture system: 51%; 3D culture system: 75%) and a greater number of recovered oocytes for *in vitro* maturation (2D culture system: 51%; 3D culture system: 75%;  $P < 0.05$ ). In both 2D and 3D culture, the preantral follicles cultured *in vitro* produced MII oocytes (2D,  $n = 5$  and 3D alginate,  $n = 1$ ) and 2-cell ( $n = 4$ ), and 8 cell ( $n = 1$ ) embryos, respectively. The concentrations of estradiol increased from Day 2 to Day 6 of culture in both 2D and 3D culture systems ( $P < 0.05$ ). Conversely, progesterone concentrations were lower in 3D alginate-cultured follicles than in 2D-cultured follicles, with differences on Days 2 and 6 of culture ( $P < 0.05$ ). The 3D alginate culture system showed higher follicle survival, resulting in higher oocyte recovery for IVM. We provide compelling evidence that a 3D alginate *in vitro* culture system offers a promising approach to achieving full *in vitro* development of caprine preantral follicles to produce mature oocytes capable of fertilization and viable embryos. This work was supported by CNPq (RENORBIO: grant number 554812/2006-1).

#### **549. A Novel Topoisomerase-II Inhibitor Increases Follicle Activation in the Neonatal Mouse Ovary in Vitro.**

Agnes Stefansdottir<sup>1</sup>, Richard Anderson<sup>1</sup>, Ian Adams<sup>1</sup>, Nicola Powles-Glover<sup>2</sup>, Norah Spears<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>University of Edinburgh, Edinburgh, United Kingdom; <sup>2</sup>AstraZeneca, Alderley Park, Cheshire, United Kingdom

In almost all mammals, oocytes enter meiosis during fetal life. By birth, they have entered the diplotene stage of prophase I of meiosis, shortly after which the process arrests. At this point, primordial follicle formation commences as they become surrounded by flattened granulosa cells. The pool of primordial follicles is non-regenerating and serves as the future source of developing follicles. From birth, cohorts of follicles from this pool are continually drawn into the growth phase, as their surrounding granulosa cells become cuboidal and proliferate. Follicle growth and development relies on a complex oocyte-granulosa cell interactive loop, necessary for follicle growth and oocyte maturation. *In vitro* studies using explanted rodent ovaries provide a good research tool for identifying if a particular chemical has potentially damaging effects on the primordial follicle pool as well as providing potential for studying mechanisms of action at a cellular and molecular level. Topoisomerase-II is required for winding and unwinding of DNA during meiotic and mitotic replication. The aim of this work was to investigate the role of topoisomerase-II on ovary development, by culturing ovaries in the presence of a novel topoisomerase-II inhibitor. Firstly, immunohistochemistry was carried out on pre- and post-natal mouse ovary sections using a topoisomerase-II  $\alpha$  antibody (Abcam, ab52934). Topoisomerase-II expression was found to shift from within the germ cells before follicle formation, to the surrounding somatic cells after follicle formation. We then used a neonatal mouse ovary culture system to assess the effects of the topoisomerase-II inhibitor on the follicular pool. Exposure of the cultured explanted newborn mouse ovaries ( $n=6$ ) to the inhibitor for 6 days *in vitro* resulted in a dose dependent increase in the level of follicle activation, with a 30.4% decrease in the number of primordial follicles ( $p<0.001$ ) and a 22.7% increase in the number of growing follicles ( $p<0.0001$ ) in ovaries exposed to the highest concentration of the topoisomerase-II inhibitor (100 $\mu\text{M}$ ). In addition, there was a 7.8% increase in the number of follicles with unhealthy oocytes in the exposed ovaries when compared to controls ( $p<0.01$ ), although the granulosa cells in these follicles were not obviously apoptotic. The inhibitor might have been expected to depress follicle growth due to its interference with DNA replication, but overall results show an agonistic effect on follicle growth, resulting in an increase in the primordial-to-primary follicle transition with increasing dose of inhibitor. Furthermore, since follicle development relies on bi-directional signals between oocytes and granulosa cells, an initial effect on granulosa cells expressing topoisomerase-II could be resulting in a secondary effect on oocyte health, which at that point are no longer expressing topoisomerase-II. We are now extending the study to the pre-natal ovary, currently using an embryonic ovary culture to explore the *in vitro* effects of the compound on meiosis and primordial follicle formation.

#### **550. Acute and Sub-Chronic Effects of Fluoxetine on Reproductive Parameters in the Prepubertal Rat.**

Jessica Romero-Reyes<sup>1</sup>, María Elena Ayala-Escobar<sup>1</sup>, Pablo G. Damián-Matsumura<sup>2</sup>, Arturo Salame-Méndez<sup>2</sup>, Roberto Domínguez<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), Mexico City, Mexico; <sup>2</sup>Universidad Autónoma Metropolitana (UAM), Mexico City, Mexico

Fluoxetine, a selective serotonin reuptake inhibitor (SSRIs), is used as an antidepressant in the treatment of mood disorders. It has been extensively employed in toddlers; however, their impact on reproductive processes has been poorly studied. The objective of this study was to analyze the effects of acute or sub-chronic administration of fluoxetine in prepubertal rats, on the ovarian follicles, estradiol concentration and the expression of the ovarian serotonin receptors 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>2B</sub>. Thirty days old female rats were injected intraperitoneally with 5 mg/kg of fluoxetine hydrochloride or saline solution (vehicle) (acute) or from days 30 to 33 of age (sub-chronic). A non-treated control group was also used. In the acute study, animals were sacrificed seventy-two hours after the vehicle or fluoxetine administration. In the second study, animals were sacrificed at the vaginal opening day (puberty) after four vehicle or fluoxetine administrations. Serum estradiol levels were measured by the ELISA. Rat ovaries were kept in polypropylene sterile tube at -70°C until analysis of the serotonin receptors (5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>2B</sub>) expression by Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction (RT-PCR) using the Access RT-PCR System kit (Promega). Fluoxetine decreased the number of ova shed by ovulating animals compared to vehicle-treated animals (7.0 $\pm$ 0.8 vs. 9.5 $\pm$ 0.3,  $p<0.05$ ) and significantly increased the incidence of atretic follicles and oocyte fragmentation. In order to determine the

ovary functionality, serum estradiol concentration was measured. Compared to the vehicle group, estradiol concentration increased (50%) after a single dosage of fluoxetine; surprisingly, in those animals treated with four doses of fluoxetine, estradiol levels were not modified. Since it has been reported that serotonin induce changes in the estradiol levels, by acting through the interaction of its receptor 5-HT<sub>1D</sub> and 5-HT<sub>2B</sub>, their expression was measured. We observed that fluoxetine increased 5-HT<sub>1D</sub> expression and decrease of 5-HT<sub>2B</sub>. The results presented herein suggest that the blockade of serotonin reuptake modifies the ovarian functions and follicular development. We propose that such effects should be taken in account when fluoxetine is prescribed to girls.

### **551. Alginate-Encapsulated Domestic Dog Follicle Growth In Vitro Affected by Initial Follicle Size and Presence of Activin.**

Jennifer Nagashima<sup>1</sup>, Alexander Travis<sup>2</sup>, David Wildt<sup>3</sup>, Nucharin Songsasen<sup>3</sup>.

<sup>1</sup>Smithsonian-Cornell JGTP, Front Royal, VA, USA; <sup>2</sup>Baker Institute / Cornell University, Ithaca, NY, USA; <sup>3</sup>Smithsonian Conservation Biology Institute, Front Royal, VA, USA

The ability to grow immature pre- and early antral follicles to the advanced antral stage to produce competent oocytes offers enormous opportunities for preserving human fertility and the genotypes of rare species. We previously have determined that physical (i.e., alginate concentration) and hormonal (presence of follicle stimulating hormone [FSH]) microenvironments influence *in vitro* development of pre- and early antral dog follicles. However, variations in response to culture conditions also may be due to different stage-specific requirements for the *in vitro* microenvironment during folliculogenesis. In the present study, we assessed the influence of follicle diameter at the onset of culture on growth under various hormonal conditions *in vitro*. Domestic dog follicles were divided into three classes based on size: (1) small, <200 µm in diameter, n = 33; (2) medium, 201 µm to <300 µm, n = 194 and (3) large, 301 to <500 µm, n = 50, and encapsulated in 0.5% alginate. In Experiment 1, follicles were cultured for 10 days in a medium supplemented with FSH (0, 1, 10 or 100 µg/ml) and luteinizing hormone [LH] (0, 1 or 10 ng/ml) in a 4 x 3 factorial design. FSH was essential ( $P < 0.05$ ) for *in vitro* follicle growth. However, there was no influence ( $P > 0.05$ ) of LH and no interaction between the two gonadotropins. A higher ( $P < 0.05$ ) percentage of growth occurred in the small ( $45.6 \pm 5.6\%$ ) and medium ( $38.9 \pm 1.6\%$ ) compared to the large ( $25.9 \pm 2.3\%$ ) cohort (mean  $\pm$  SEM). Nevertheless, mean follicle diameter on Day 10 was higher ( $P < 0.05$ ) in the large ( $436.6 \pm 8.7$  µm) compared to the small ( $236.3 \pm 8.6$  µm) or medium ( $336.3 \pm 4.6$ ) size groups. In Experiment 2, preantral and early antral follicles were divided into the three size classes and cultured in medium containing 10 µg/ml FSH and +/- 100 ng/ml activin. Although activin presence promoted improved ( $P < 0.05$ ) follicle growth in all groups, the small follicles experienced the most marked ( $P < 0.05$ ) overall increase in diameter. On average, follicles cultured in FSH plus activin increased  $72.6 \pm 28.5\%$  in size over 10 days compared to only  $35.0 \pm 21.0\%$  for those in FSH alone. Overall, these findings reveal that dog follicles of smaller size have the capacity to grow more rapidly than their larger counterparts. Although the larger follicles also increase significantly in size, more advanced growth may be restricted by a physical expansion barrier presented by the rigidity imposed by alginate. Activin clearly offers an enhancement benefit regardless of initial follicle size. Next steps should focus on exploring a physical microenvironment that allows more expansive follicle growth, including formation of the critical antral cavity.

### **552. Androgens Stimulate Follicle Development in Isolated Mouse Preantral Follicles in Culture.**

Mhairi Laird<sup>1</sup>, Kate Hardy<sup>1</sup>, Stephen Franks<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Imperial College London, London, Greater London, United Kingdom

Polycystic ovary syndrome (PCOS) is the commonest endocrine disorder in women of reproductive age and is a major cause of anovulatory infertility. The most common characteristics of PCOS are hypersecretion of ovarian androgens and abnormal follicle development. Abnormalities in antral follicle development are well recognized but less is known about preantral follicle development and the role of androgen exposure at these stages has still to be fully defined. One plausible androgen target protein is anti-Müllerian hormone (AMH), which is known to have a role in follicle activation. However, studies on the effects of hyperandrogenism on follicular AMH have yielded conflicting results. The aim of this study was to investigate the effects of androgens, and their interaction with key growth factors, on preantral follicular growth, survival and steroidogenesis, using culture of isolated follicles from the mouse ovary. Ovaries were collected from juvenile C57BL/6 mice at PND 15. Preantral follicles were mechanically isolated using acupuncture needles and cultured individually in 96 well plates for 72 hours. Follicles were grown in the presence or absence of DHT (a non-aromatisable androgen), testosterone (an aromatisable androgen) or flutamide (androgen receptor (AR) inhibitor). Subsequent experiments were then conducted with follicles grown in the presence or absence of DHT, follicle stimulating hormone (FSH) or a combination of DHT and FSH. Follicle diameters were measured at 0, 24, 48 and 72 hours using ImageJ and at the end of culture follicles were either fixed for immunohistochemical localisation of AMH, AR, Ki67 (a proliferation marker) or caspase 3 (a marker of apoptosis), or snap frozen for gene expression studies. DHT and testosterone (10nM) significantly increased follicular growth compared to control medium ( $P < 0.0001$ ), while the addition of flutamide reversed this effect. Immunohistochemical studies detected AMH, AR, Ki67 and occasional caspase 3 in granulosa cells of all preantral follicle treatment groups. Treatment with androgen caused an increase in the number of AR positive cells compared to control and a gradient of AMH staining was observed. AMH staining was confined to granulosa cells adjacent to the oocyte in DHT treated follicles, while AMH was observed in the majority of granulosa cells in controls. The proportion of Ki67 positive cells significantly increased in follicles cultured in the presence of androgen compared to control ( $P < 0.02$ ) while there were no observable differences in caspase 3 staining. Addition of DHT to preantral follicles decreased gene expression of AMH and CYP11A but significantly increased expression of follicle stimulating hormone receptor (FSHR) and steroid acute regulatory protein (StAR). The addition of flutamide ablated these effects of DHT treatment. A similar pattern of gene expression was observed with testosterone treatment. As expected, treatment with FSH significantly increased follicular growth. Moreover, treatment with a combination of DHT and FSH significantly increased follicular growth compared to DHT or FSH treatment alone ( $P < 0.0001$ ). In conclusion, this study provides strong evidence that androgens have a direct role in the aberrant growth of preantral follicles in PCOS by mechanisms which include down-regulation

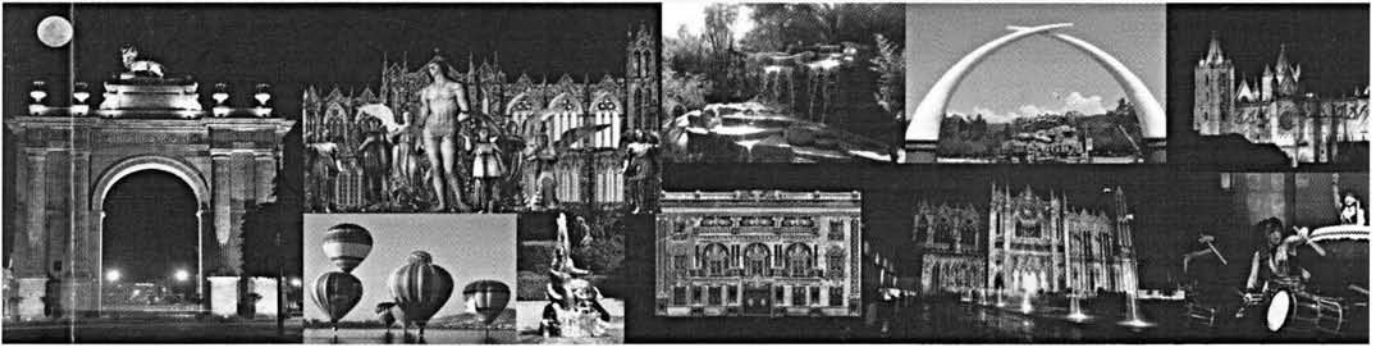


SMCF

# LIV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

## 2011

### PROGRAMA



DEL 10 AL 14 DE SEPTIEMBRE  
LEÓN, GUANAJUATO, MÉXICO

## **¿LA SEROTONINA REGULA DIRECTAMENTE LAS FUNCIONES DEL OVARIO EN LA RATA PREPÚBER?**

**Romero-Reyes J1, Ayala-Escobar ME1, Damian-Matzumura PG2, Salame-Méndez A2, Domínguez R1**

**(marayalamx@yahoo.com.mx)**

**UIBR. Laboratorio de Pubertad. FES-Zaragoza, 1UNAM. México. 2. Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, UAM-I.**

La serotonina (5-HT) participa en la modulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de las gonadotropinas (hormona luteinizante (LH) y hormona estimulante del folículo (FSH), esenciales para el mantenimiento de las funciones del ovario. En la actualidad se ha incrementado el uso de fármacos que modifican al sistema serotoninérgico y que son ampliamente utilizados en el tratamiento clínico de diversos desordenes emocionales, sin embargo, no se han considerado los efectos que estas sustancias puedan tener en el aspecto reproductivo, especialmente sobre las funciones del ovario. Por ello, en el presente estudio se evaluaron los efectos de la administración de un inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT, la fluoxetina hidrociorada vía sistémica sobre la ovulación, así como la síntesis de progesterona y estradiol en la rata.

Ratas hembras de 30 días de edad de la cepa CIIZ-V se les administró fluoxetina (FLX) en una dosis de 5 mg/kg de p.c. por vía intraperitoneal (ip) disuelta en solución salina (0.9%) desde el día 30 hasta el 33. Como grupo de comparación se utilizaron animales testigo absoluto (TA) y aquellos que recibieron solución salina (VH) ip. A todos los animales se les registró el día de la apertura vaginal, a partir de ese momento se tomaron frotis vaginales diariamente y los animales se sacrificaron el día que presentaron el primer estro vaginal, al momento de la autopsia se realizó la disección de los oviductos en donde se contó el número de ovocitos con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se disecaron el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM), la hipófisis y los ovarios para la evaluación de 5-HT por cromatografía de líquidos. En suero se realizó la cuantificación de progesterona (P<sub>4</sub>) y estradiol (E<sub>2</sub>) por ELISA.

En comparación con el grupo TA y VH en los animales que recibieron FLX y sacrificados en el día del primer estro vaginal, no se modificó la concentración de 5-HT en HA (FLX: 1.35±0.10 vs. TA: 1.37±0.13; VH: 1.39±0.05, ns) e HM (FLX: 1.05±0.11 vs. TA: 1.02±0.09, VH: 1.25±0.12, ns), o hipófisis (FLX: 0.28±0.036 vs. TA: 0.19±0.02, VH: 0.24±0.016, ns), mientras que, en el ovario se incrementó (FLX: 0.30±0.05 vs. TA: 0.20±0.03; VH: 0.19±0.03, p<0.05). La concentración de P<sub>4</sub> en el suero no se modificó y la de E<sub>2</sub> se incrementó en los animales tratados con FLX (Fig 1) y el número de ovocitos fue menor (FLX: 7.16±0.79 vs. TA: 9.13±0.35, VH: 9.45±0.28, p<0.05).

Con base en estos resultados es posible sugerir que el incremento en la concentración de 5-HT en el ovario inducido por la administración de FLX ejerce un efecto estimulante sobre la síntesis de estradiol.

MEETING INFO

SSR 44<sup>th</sup> Annual Meeting

July 31 – August 4, 2011  
Portland, Oregon  
Oregon Convention Center

Reproduction and  
the World's Future

Monday, 1 August  
Poster Session A/LB-A

- and Human. Masayuki Shimada, Tomoko Kawai, Ikko Kawashima, JoAnne S. Richards, Youko Fujita, Chiaki Ikeda, Hiroaki Negishi
629. Relationship Between Resumption of Ovarian Cyclicity and Blood Urea Nitrogen (BUN) Concentration after Superovulation Treatment to Korean Native Cattle Donors. Jun-Kyu Son, Changyong Choe, Sang-Rae Cho, Seong-Heum Yeon, Dong-Soo Son
632. Effects of the Inhibition of the Serotonin-Uptake on Spontaneous Ovulation. Jessica Romero-Reyes, Daniel Bahena-Alvarez, Maria Elena Ayala-Escobar, Pablo G. Damian-Matsumura, Roberto Dominguez
635. Regulation of Anti-Mullerian Hormone Receptor Type II (AMHR2) Is Mediated by Oocyte-Specific Factors. Daniel H. Poole, Olga M. Ocon-Grove, Alan L. Johnson
638. Ovarian Expression and Regulation of the Stromelysins During the Perioovulatory Period in the Human and Rat. Lauren A. McCord, Feixue Li, Katherine L. Rosewell, Mats Brannstrom, Thomas E. Curry
641. Developmental Programming: Impact of Prenatal Testosterone Excess on Ovarian Cell Proliferation and Survival Factors. Vasantha Padmanabhan, Natalia R. Salvetti, Almudena Veiga-Lopez, Hugo H. Ortega
644. Evidence That Activation of AMPK by DHT Inhibits Granulosa Cell Proliferation by Reducing ERK Phosphorylation. Pradeep P. Kayampilly, K.M.J. Menon
647. Ovarian Expression of Cartilage Oligomeric Matrix Protein as a Potential Biomarker of Antral Follicle Development in the Mouse. Eugene Galdones, Beatriz Peñalver Bernabé, Robin M. Skory, Dragan Mackovic, Linda J. Broadbelt, Lonnie D. Shea, Teresa Woodruff
650. Follicular Fluid Hydrogen Peroxide and Lipid Hydroperoxide Levels in Relation to the Health and Dominance of Bovine Antral Follicles. Catherine M.H. Combelles, Margo L. Hennes, Hope Y. Yu
653. Expression of Fibrillins, Latent TGFbeta Binding Proteins and TGFbetas in the Bovine Fetal Ovary. Helen Irving-Rodgers, Nicholas Hatzirodos, Katja Hummitzsch, Samuel Lee, Wendy Bonner, Laetitia Sabatier, Dieter Reinhardt, Raymond J. Rodgers
656. The Indispensable Role of Androgen in Follicular Development of Wild Female Ground Squirrels (*Citellus dauricus Brandt*) During Non-Breeding Season. Xiaonan Li, Ji Weng, Shuqiang Liu, Meiyu Xu, Qiang Weng, Gen Watanabe, Kazuyoshi Taya
659. Moderate Inhibition of Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling Induces Rapid Growth of Cultured Preantral Follicles. Mark A. Fenwick, Stephen Franks, Kate Hardy

molecule were upregulated in heifer follicles (ACPF5, SLC26A11, ASPM, APLNR). Analysis of granulosa DEGs identified one important network comprising genes involved in the functions of Cellular Assembly, Organization and Carbohydrate Metabolism. Here, HNF4A served as a hub molecule, having direct interactions with several granulosa genes upregulated in heifer follicles (PHTF1, TMEM128, SRP19, LAPTM4A, C9ORF64, NUFIP1, RAB10, CPT1A). In summary, follicular fluid P4 concentration and mRNA expression for theca and granulosa cell genes involved in lipid and carbohydrate metabolism, cell-to-cell signalling, cellular assembly and steroid production were higher in preovulatory follicles from heifers than from cows. This suggests that dairy heifer follicles are further advanced in luteinization after the LH surge than cow follicles, which may be beneficial for oocyte maturation, future CL formation and function, and fertility. Funded by Science Foundation Ireland (07/SRC/B1156).

**632. Effects of the Inhibition of the Serotonin-Uptake on Spontaneous Ovulation.** Jessica Romero-Reyes, Daniel Bahena-Alvarez, Maria Elena Ayala-Escobar, Pablo G. Damian-Matsumura, and Roberto Dominguez. Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico; Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa, Mexico City, Mexico

Serotonin participates in the regulation of ovarian functions (steroidogenesis and ovulation). Several drugs enhancing or inhibiting serotonergic system are widely used on the treatment of diverse affective disorders. There is scarce information about the effects of those drugs on the ovarian functions. Unpublished results show that the injection of fluoxetine hydrochloride, a selective serotonin transporter inhibitor, results in a significant increase in serotonin levels in the ovaries. Present study was designed to analyze the effects serotonin increase induced by fluoxetine in prepubertal rats, on the first spontaneous ovulation. Thirty-days old female rats were injected intraperitoneally with 5 mg/kg of fluoxetine hydrochloride or saline solution (0.9%) (vehicle) from 30 to 33 day. A non-treated control group was also used. The day of vaginal opening (puberty) was recorded and vaginal smears taken thereafter. All animals were sacrificed on the day of first vaginal estrus. At autopsy, ova were counted and serotonin levels in the ovaries of 15 rats (treated and untouched control) were measured by high-pressure liquid chromatography. The ovaries of another groups of rats were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin wax, sectioned serially at 10  $\mu$ m, and stained with haematoxylin-eosin; follicular population was analyzed and the follicles were classified into three categories based on their mean diameter: Class 1: <275  $\mu$ m, Class 2: 275-450  $\mu$ m and Class 3: >450  $\mu$ m. The incidence of follicular atresia was recorded. There were no differences in the age of vaginal opening, between control group and treated with fluoxetine. In comparison with the control group and vehicle, the concentration of serotonin was higher in the ovary of animals injected with fluoxetine hydrochloride, the ovulation rate in rats treated was similar to control animals. The number of ova shed by ovulating animals was lower in those animals treated with fluoxetine. An increase in the number of class 1 and 2 follicles was observed, without changes in the preovulatory follicles. The incidence of atretic follicles (2 to 4 oocytes in one follicle, or oocyte fragmentation was higher in rats treated with fluoxetine. The results presented herein suggest that in the prepubertal-pubertal animal serotonin increases at the ovaries plays an inhibitory role on the mechanisms regulating the development and differentiation of the follicles and the first ovulation. This work was supported by DGAPA-PAPIIT-IN219408.

**633. Morphology of Bovine Ovarian Preantral Follicles Vitrified with Dimethylsulfoxide and Sucrose Plus Alpha-Tocopherol.** Carolina Rodriguez Jimenez, Ciro Alexandre Alves Torres, Amanda de Mattos Medeiros, Leandro Swerts da Silva, Eduardo Paulino da Costa, Rafael Jose Otero Aroyo, and Giancarlo Magalhaes dos Santos. Federal University of Vicosa, Vicosa, Brazil

The manipulation of oocytes from ovarian preantral follicles (MOEPF) help to know the mechanisms of the preantral folliculogenesis and in the animal reproduction by isolating thousands of oocytes from preantral follicles from one ovary and theirs in vitro culture until the maturation stage. These oocytes from preantral follicles (PF) are less susceptible to cryoinjuries than the mature ones, with better chances of been cryopreserved *in situ* or isolated from the ovarian microenvironment. The objective of the study was to vitrify the ovarian PF of cows with dimethylsulfoxide (DMSO) and sucrose (SAC) plus  $\alpha$ -tocopherol (TOC), by evaluation of the morphology of PF *in situ*. The study was conducted in the Laboratory of Animal Science, University Federal of Vicosa. Ovaries were collected from slaughtered cows, with undefined breed and age at different stages of the estrous cycle. Qualitative variables to morphology of the PF were analysed by non parametric test Kruskal-wallis, at 5% probability. Sixty-six ovaries of bovine females were used, were cutted with 5 mm<sup>3</sup> approximately. Fragments were randomly assigned to nine treatments, represented by control (fixed in fresh) and four vitrification solutions (VS) with two thawing types each, represented as follows: SV1m: DMSO, with thawing in minimum essential medium (MEM); SV1s: DMSO, with thawing in SAC; SV2m: DMSO + SAC, with thawing in MEM; SV2s: DMSO + SAC, with thawing in SAC; SV3m: DMSO + SAC + TOC 5 mM, with thawing in MEM; SV3s: DMSO + SAC + TOC 5 mM, with thawing in SAC; SV4m: DMSO + SAC + TOC 10 mM, with thawing in MEM; SV4s: DMSO + SAC + TOC 10 mM, with thawing in SAC. Each cut, after thawing, was fixed for histology classical and stained with hematoxylin and eosin and observed under 400x optical microscope. Thirteen thousand and five hundred PF were analyzed, 6,238 primordial, 6,812 primary and 450 secondary, which were classified as good, regulate and bad, with evaluating morphology of granulosa cells and nucleus in PF. It was concluded that DMSO, SAC and TOC may be used in the

cryopreservation of bovine females PF. It is recommended to work with DMSO, SAC and 10 TOC mM thawed in MEM, and DMSO,SAC thawed in MEM or SAC to cryopreserve the morphology of preantral follicles.

**634. Superovulatory Response According to the Status of Various Follicular Classes on Day of Initiation of the Superovulatory Treatment in Cattle.** Iraj Ashrafi, Hamid Kohram, and Mehdi Poorhamdollah. University of Tehran, Karaj, Iran

Intrinsic factors related to ovarian status at the time of initiation of the superovulatory treatment can account for a large portion of the variability in superovulatory response. The aim of this study was to investigate follicular and ovulatory responses and responses in terms of fertilized structures and unfertilized ova in superovulated cows according to the status of various follicular classes on day 0 (day of initiation of the superovulatory treatment), on the day of estrus during superovulation, and on the day of embryonic collection. 102 superovulation cycles were selected. Animal were superstimulated between days 8 and 12 of estrous cycle with 400mg follitropin- $\alpha$  given in decreasing doses over 4d period and luteolysis was induced with 2 im injections of cloprostenol (Estrumate, Coopers Agropharm Inc., Ontario). The ovaries of all cows were examined by ultrasonography with a real-time linear scanning ultrasound diagnostic system (Ls-300-A: Tokyo Keiki Co., Tokyo, Japan; 7.5 MHz Transducer) on day 0, on the day of estrus during superovulation and on the day of embryonic collection to identify all visible follicles (>3 mm in diameter) and the CL, respectively. All follicles larger than 3 mm were counted and classified according to their diameter in one of the following classes: 4 to 6 mm, 7 to 10 mm,  $\geq$  11 mm and  $\geq$  7 mm. Subsequently, each of these four classes was divided in two subgroup (low, high) based on the number of follicles observed by ultrasonography on day 0. For the analysis of superovulatory response, the general model included variation due to follicle subgroup (low vs high) for each of the four classes of follicles (i.e., 4 to 6 mm 7 to 10 mm,  $\geq$ 11 mm or  $\geq$ 7 mm). For these analyses, least square means ( $\pm$  SEM) were used. The results showed that the follicular and ovulatory responses were higher ( $p < 0.01$ ) in cows that were superovulated in the presence of a high ( $\geq 6$ ) than in the presence of a low ( $\leq 5$ ) number of follicles 4 to 6 mm in diameter. Follicular and ovulatory responses did not differ ( $p > 0.1$ ) according to the status of the three other follicular classes studied. The mean numbers of fertilized structures and unfertilized ova also were not influenced ( $p > 0.1$ ) by the status of any of the follicular classes studied. In Conclusions, on the day of initiation of superstimulation, the presence of a high number ( $\geq 6$ ) of recruitable follicles (4 to 6 mm) is associated with increases in mean follicular and ovulatory responses.

**635. Regulation of Anti-Müllerian Hormone Receptor Type II (AMHR2) Is Mediated by Oocyte-Specific Factors.** Daniel H. Poole, Olga M. Ocon-Grove, and Alan L. Johnson. Pennsylvania State University, University Park, PA, USA

Anti-Müllerian hormone (AMH) produced by granulosa cells may play a pivotal role in granulosa cell differentiation and follicle selection. In cattle, it has been recently shown that FSH inhibits *AMH* expression, whereas bone morphogenetic proteins (e.g. BMP4 and 6) enhance *AMH* expression. Anti-Müllerian hormone receptor type II (AMHR2) receptor dimerizes with a type I receptor to perpetuate AMH signaling. Wilm's tumor protein (WT1) is an essential transcription factor for AMHR2 expression. We have previously demonstrated that *AMHR2* expression in bovine granulosa cells (bGC) is highest in unselected follicles (small; 5-8 mm) and expression decreases as follicles grow in size and undergo selection (large; 13-24 mm). Furthermore, AMH signaling in small antral follicles suppresses *CYP19A1* expression and bGC proliferation, thus serving to maintain bGC in an undifferentiated state. To date, regulation of AMHR2 expression in granulosa cells and its role in follicle selection is poorly understood. It is hypothesized that the expression of AMHR2 in bGC is regulated by oocyte specific factors and that AMH signaling can regulate bGC function. The objectives of the present study were to: 1) compare AMHR2 expression with additional TGF $\beta$  super family members in mural and cumulus bGC and oocytes; 2) determine the factors that regulate AMHR2 expression in small follicle bGC and 3) examine the role of AMH signaling in bGC differentiation. Bovine mural GC and cumulus-oocyte complexes were isolated from small (5-8 mm) antral follicles obtained from dairy cattle ovaries. Following isolation, oocytes were completely denuded from cumulus cells with 0.3% hyaluronidase, and then both cell types were frozen for RNA analysis. *BMP15*, *GDF9*, and *BMP6* mRNA was solely expressed in the denuded oocytes whereas *BMP2* mRNA was amplified from both cumulus bGC and oocytes. Further analyses revealed greater expression of *AMH* and *AMHR2* in cumulus cells compared to denuded oocytes. Mural bGC from 5-8 mm follicles were cultured in media containing 2.5% FCS for either 3 or 24 hrs with BMP2 (50 ng/ml), BMP6 (25 and 50 ng/ml), or BMP15 (10 ng/ml). Treatment of bGC cells with BMP6 and BMP15, but not BMP2, significantly increased *AMHR2* expression after 24 hrs *in vitro* when compared to controls ( $p < 0.05$ ). By comparison, expression of *AMH* mRNA was greater when bGC were cultured for 24 hrs with BMP2 and BMP6, but not BMP15, when compared to controls ( $p < 0.05$ ). Furthermore, *CYP19A1* expression was suppressed in bGC after 24 hrs in culture with BMP15. Short-term treatment of BMP15 increased *WT1* expression in bGC after 3 hrs ( $p < 0.05$ ). Finally, bGC were cultured with 0, 10, 25, or 100 ng/ml rhAMH to evaluate a potential role for AMH in bGC differentiation. Increasing concentrations of AMH reduced *CYP19A1* expression in cultured bGC ( $p < 0.05$ ). It is concluded that oocyte specific factors, such as BMP6 and BMP15, upregulate *AMHR2* and *WT1* expression and thus serve to inhibit differentiation in





# LIII CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

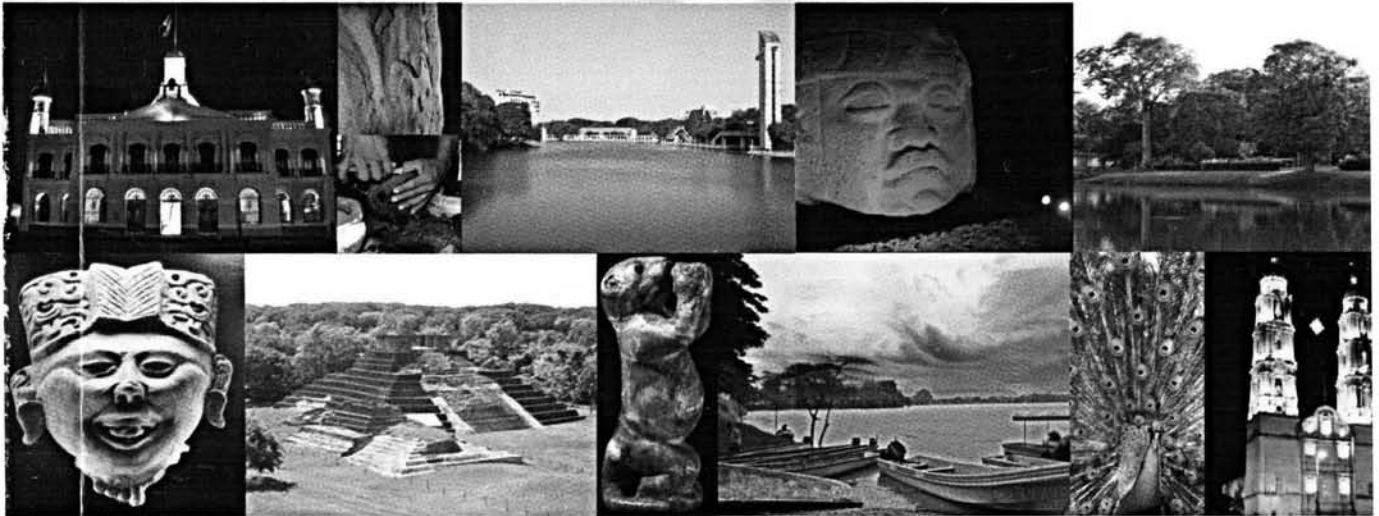
**SMCF**

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

2010



## PROGRAMA



DEL 26 AL 30 DE SEPTIEMBRE  
VILLAHERMOSA, TABASCO

## **INHIBICIÓN DE LA RECAPTURA DE SEROTONINA EN EL OVARIO DE LA RATA Y SUS EFECTOS EN LA OVULACIÓN**

**Romero J, Bahena D, Ayala ME, Domínguez R.**

(marayalamx@yahoo.com.mx)

**UIBR. Laboratorio de Pubertad. FES-Zaragoza, UNAM. México.**

La serotonina (5-HT) participa en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas y de las gonadotropinas, y se sugiere que participa en la modulación de las funciones del ovario. Actualmente se ha incrementado el uso de fármacos que modifican al sistema serotoninérgico y que son ampliamente utilizados en el tratamiento clínico de diversos desordenes emocionales, sin embargo, no se han considerado los efectos que estas sustancias puedan tener en el aspecto reproductivo, especialmente sobre las funciones del ovario. Por ello en el presente estudio se evaluaron los efectos de la administración de un inhibidor selectivo de la recaptura de 5-HT, la fluoxetina hidroclicorada vía sistémica sobre la primera ovulación en la rata.

Ratas hembras de 30 días de edad de la cepa CIIZ-V se les inyectó fluoxetina hidroclicorada (FLX) en una dosis de 5mg/kg de p.c. por vía intraperitoneal (ip) disuelta en solución salina (0.9%) desde el día 30 hasta el 33. Como grupo de comparación se utilizaron animales testigo absoluto (TA) y aquellos que recibieron solución salina (VH) ip. A todos los animales se les registró el día de la apertura vaginal, a partir de ese momento se tomaron frotis vaginales diariamente y los animales se sacrificaron el día que presentaron el primer estro vaginal, al momento de la autopsia se realizó la disección de los oviductos en donde se contó el número de ovocitos con ayuda de un microscopio estereoscópico. Se disecaron el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM), así como los ovarios para la evaluación de 5-HT por cromatografía de líquidos.