



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

SEROTONINA Y MARCADORES DE LA APOPTOSIS EN EL OVARIO
DE LA RATA HEMBRA PREPÚBER

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTOR EN CIENCIAS

PRESENTA:

ELOIR GALLEGOS PACHECO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM

COMITÉ TUTOR: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA, UNAM
DR. ANDRÉS ARAGÓN MARTÍNEZ
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA, UNAM

CIUDAD DE MÉXICO

Enero, 2023.



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.

COORDINACIÓN DEL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

OFICIO CPCB/1085/2022

ASUNTO: Oficio de Jurado

M. en C. Ivonne Ramírez Wence
Directora General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día **29 de agosto de 2022** se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTOR EN CIENCIAS** del estudiante **GALLEGOS PACHECO ELOIR** con número de cuenta **94371248** con la tesis titulada **“Serotonina y marcadores de la apoptosis en el ovario de la rata hembra prepúber”**, realizada bajo la dirección del **DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR**, quedando integrado de la siguiente manera:

Presidente: DR. RODRIGO ERICK ESCARTIN PÉREZ
Vocal: DRA. MARTA CATALINA ROMANO
Vocal: DRA. MARÍA DE LA LUZ NAVARRO ANGULO
Vocal: DRA. MARÍA ISABEL SOTO CRUZ
Secretario: DR. ANDRÉS ARAGÓN MARTÍNEZ

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

ATENTAMENTE
“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad Universitaria, Cd. Mx., a 23 de noviembre de 2022

COORDINADOR DEL PROGRAMA



DR. ADOLFO GERARDO NAVARRO SIGÜENZA



Agradecimientos institucionales

Al **Posgrado en Ciencias Biológicas** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** por el gran apoyo otorgado durante todo el doctorado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (**CONACyT**) por la beca otorgada para la realización de la Tesis de Doctorado (CVU: 165390).

Este trabajo fue apoyado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN226017 y IN218920**).

A mi tutora, la **Dra. María Elena Ayala Escobar** por su invaluable dedicación humana y académica durante el desarrollo de este proyecto dentro del programa de Doctorado en el Posgrado de Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

A los miembros de mi comité tutorial por su apoyo, consejos y orientación durante mi formación académica:

Dr. Roberto Domínguez Casalá (FES-Zaragoza, UNAM)

Dr. Andrés Aragón Martínez (FES-Iztacala, UNAM).

A los miembros del jurado de examen, por sus aportaciones para enriquecer el presente trabajo:

Dr. Rodrigo Erick Escartín Pérez

Dra. Marta Catalina Romano Pardo

Dra. María de la Luz Navarro Angúlo

Dra. María Isabel Soto Cruz

Dr. Andrés Aragón Martínez

Agradecimientos a título personal

A la Dra. María Elena Ayala Escobar, por permitirme volver a trabajar con ella y continuar aprendiendo, por otorgarme todas las facilidades para realizar este trabajo, y por todo su apoyo profesional y personal, que a pesar de todo lo que ocurrió a lo largo de estos más de cuatro años siempre estuvo presente como ejemplo de entereza y dedicación.

A la Dra. Juana Monroy Moreno de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, UMIEZ, FES-Zaragoza, por toda su ayuda en el procesamiento de muestras y cuantificación por cromatografía de líquidos, y por todo su apoyo durante el trabajo y en lo personal.

Al Dr. Andrés Aragón Martínez y Cindy Rivas Arzaluz de la UBIMED, FES-Iztacala por todo el apoyo con la técnica de inmunohistoquímica.

A la Dra. Marta Elena Castro Manreza de la UMIEZ, FES-Zaragoza, por toda su ayuda para establecer las condiciones para realizar el Western Blot.

Al Mtro. David Roberto Chavira Ramírez del Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición, Salvador Zubiran, por su ayuda en la cuantificación de hormonas esteroides.

A los M.V.Z. Adriana Altamirano Bautista, Román Hernández Meza y Dolores Elizabeth Guzmán Andrade, responsables del bioterio de la FES-Zaragoza, por su invaluable trabajo en el cuidado y mantenimiento de los animales usados en este estudio.

A la Técnico Laboratorista Dulce por toda su ayuda en la realización de los cortes histológicos utilizados en la realización de este trabajo.

A la Auxiliar de Laboratorista Gabriela Guadarrama, por toda su ayuda para mantener las condiciones para trabajar en el laboratorio y por hacer el trabajo mas agradable.

Al personal administrativo del posgrado en ciencias biológicas de quienes recibí apoyo en todo momento.

A todos los compañeros del laboratorio de pubertad, a quienes tuve la oportunidad de enseñarles parte de lo que aprendí y de los que también tuve la oportunidad de aprender, Marisol, Maribel, Alexis, Emiliano, Asahel, Enrique, Sughey, Ximena, Vivian y Antonio.

A los compañeros con los que compartimos el espacio y que hicieron el trabajo mas agradable, Monica, Gaby, Fanny, Paula, Alex, Toño y Eduardo.

INDICE

Resumen.....	III
Abstract.....	V
I. Introducción.....	1
II. Objetivos.....	4
II.1 Objetivo General.....	4
II.2 Objetivos Particulares.....	4
III. Antecedentes.....	5
III.1 Serotonina.....	5
III.1.1 Receptores a serotonina.....	7
III.1.2 Serotonina y el eje Hipotálamo-Hipófisis.....	10
III.2 Estructura y funciones del ovario.....	12
III.2.1 Esteroidogénesis.....	13
III.2.2 Desarrollo folicular.....	15
III.2.3 Atresia folicular.....	18
III.2.4 Apoptosis en el ovario.....	19
III.3 Anfetaminas.....	22
III.3.1 p-Cloroanfetamina.....	25
III.4 Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina.....	26
III.4.1 Fluoxetina.....	26
IV. Metodología.....	29
IV.1 Autopsia.....	30
IV.2 Perfusión.....	30
IV.3 Cuantificación de 5-HT y 5-HIAA.....	31
IV.4 Cuantificación de Hormonas Esteroides.....	31
IV.5 Desarrollo folicular.....	32
IV.6 Análisis TUNEL.....	32
IV.7 Inmunohistoquímica para R5-HT7.....	33
IV.8 Western blot.....	33
IV.9 Análisis estadístico.....	34
V. Resultados.....	35
1 Inhibición del sistema serotoninérgico.....	35
1.1 pCA y concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio y en el ovario.....	35
1.2 pCA y concentración sérica de testosterona y estradiol.....	39

1.3 pCA y población folicular	39
1.4 Identificación del receptor 5-HT ₇	44
1.5 pCA y presencia de las proteínas Bax, Caspasa 3 y R5-HT ₇	44
2. Estimulación del sistema serotoninérgico	46
2.1 Flx y concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio, y en el ovario	46
2.2 Flx y concentración sérica de testosterona y estradiol	51
2.3 Flx y población folicular	51
2.4 Flx y presencia de las proteínas Bax, Caspasa 3 y R5-HT ₇	55
VI. Discusión	57
1. Inhibición del sistema serotoninérgico	57
2. Estimulación del sistema serotoninérgico	62
3. Limitaciones del estudio.....	64
VII. Conclusiones	66
VIII. Referencias	67
IX. Apéndices.....	78

RESUMEN

La serotonina (5-HT) en el ovario estimula la producción de estradiol, hormona que es un factor de sobrevivencia de las células de la granulosa y estimula el desarrollo folicular. En diferentes tipos celulares la 5-HT induce proliferación o muerte celular por apoptosis. En el ovario, la apoptosis de las células de la granulosa, teca y del ovocito conduce a la atresia o degeneración del folículo ovárico. No existen reportes que muestren que la 5-HT sea un factor asociado con el desarrollo folicular y la apoptosis en el ovario. Por lo anterior, en el presente trabajo analizamos el papel de la 5-HT en el desarrollo folicular, apoptosis de las células de la granulosa, la expresión de la caspasa-3 y de las proteínas Bax, y del receptor 5-HT₇.

Se utilizaron ratas de 30 días de edad de la cepa CIIZ-V a las cuales se les inyectó intraperitonealmente una dosis de p-cloroanfetamina (pCA; inhibidor del sistema serotoninérgico) (10 mg/Kg de peso corporal) o de Fluoxetina (Flx; estimulante del sistema serotoninérgico) (5 o 10 mg/Kg de peso corporal; Flx5 y Flx10 respectivamente). Como grupo de comparación se utilizaron animales que recibieron una inyección de solución salina (Vh). Animales de los diferentes grupos experimentales se autopsiaron a las 48 o 120h después del tratamiento. Se cuantificó la concentración de 5-HT y su metabolito (5-HIAA) en el hipotálamo y ovario; la concentración de testosterona y estradiol en el suero; el desarrollo folicular; marcaje terminal de desoxinuceotidil transferasa (TUNEL) en células de la granulosa; inmunodetección del receptor 5-HT₇, y caspasa 3; la presencia de las proteínas proapoptóticas BAX, caspasa-3 activa y el receptor a serotonina 5-HT₇.

En comparación con los animales que se inyectaron con Vh, en los que recibieron pCA, la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo disminuyó a las 48 y 120h postratamiento y en los ovarios a las 120h. La concentración de estradiol disminuyó en todas las edades estudiadas. La atresia se incrementó en los folículos en las diferentes etapas de desarrollo a las 48h, mientras que, a las 120h, solo en los preovulatorios. La proporción de folículos con marca intensa (más de 10 células de la granulosa) positiva a TUNEL aumentó en los folículos en las diferentes etapas de desarrollo, así como la expresión de la proteína BAX, mientras que las proteínas caspasa-3 y la del receptor 5-HT₇ no se modificaron.

En comparación con el grupo de animales con Vh, en el hipotálamo de los animales que fueron inyectados con Flx5 o Flx10 y autopsiados a las 48h postratamiento, la concentración del 5-HIAA y 5-HT aumentó, respectivamente. En los que fueron autopsiados a las 120h postratamiento, en el hipotálamo y en los ovarios de los animales inyectados con Flx5

disminuyó la concentración de 5-HT; en los que recibieron Flx10 disminuyó la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo. La atresia se incrementó en los folículos preovulatorios de los animales que se inyectaron con Flx5 y autopsiados a las 48h y a las 120h después del tratamiento con Flx10. En los que se les inyectó Flx5 o Flx10, la proporción de folículos con marca intensa positiva a TUNEL aumentó a las 120h en las diferentes etapas de desarrollo, mientras que la proteína Caspasa-3 disminuyó y las proteínas BAX y la del receptor 5-HT₇ no se modificaron.

Los resultados del presente trabajo muestran que en la rata hembra prepúber la 5-HT participa en la modulación de la síntesis de estradiol en el ovario y en el desarrollo folicular.

ABSTRACT

Serotonin (5-HT) in the ovary stimulates the production of estradiol, a hormone that is a survival factor of granulosa cells and stimulates follicular development. In different cell types 5-HT induces cell proliferation or death by apoptosis. In the ovary, apoptosis of the granulosa, and theca cells and oocyte leads to atresia or degeneration of the follicle. There are no reports showing that 5-HT is a factor associated with follicular development and apoptosis in the ovary. Therefore, in this study we analyzed the role of serotonin in follicular development, apoptosis of granulosa cells, the presence of caspase-3, Bax, and 5-HT₇ receptor proteins.

Females of 30-day-old rats of the CIIZ-V strain were injected intraperitoneally with a dose of p-chloroamphetamine (pCA; serotonergic system inhibitor) (10 mg/kg body weight) or Fluoxetine (Flx; serotonergic system stimulant) (5 or 10 mg/kg body weight; Flx5 and Flx10 respectively). Animals that received the injection of saline (Vh) were used as a comparison group. Animals from the different experimental groups were autopsied at 48 or 120h after treatment. The concentration of 5-HT and its metabolite, 5-HIAA, in the hypothalamus and ovary were quantified; the concentration of testosterone and estradiol in the serum; follicular development; terminal marking of deoxynucleotyl transferase (TUNEL) in granulosa cells; immunodetection of the 5-HT₇ receptor, and caspase 3; the presence of proapoptotic proteins BAX, active caspase-3 and the receptor to serotonin 5-HT₇.

Compared to animals injected with Vh, in those receiving pCA, the concentration of 5-HT and 5-HIAA in the hypothalamus decreased at 48 and 120h post-treatment and in the ovaries at 120h. Estradiol concentration decreased at all ages studied. Atresia increased in the follicles in the different stages of development at 48h, while at 120h, only in the preovulatory ones. The proportion of follicles with intense mark (more than 10 cells of the granulosa) positive to TUNEL increased in the follicles in the different stages of development, as well as the presence of the BAX protein, while the proteins caspase-3 and that of the receptor 5-HT₇ were not modified.

Compared to group of animals with Vh, in the hypothalamus of animals that were injected with Flx5 or Flx10 and autopsied 48h post-treatment, the concentration of 5-HIAA and 5-HT increased, respectively. In those autopsied at 120h post-treatment, in the hypothalamus and ovaries of the animals injected with Flx5 the concentration of 5-HT decreased; in those receiving Flx10, the concentration of 5-HT and 5-HIAA in the hypothalamus decreased. Atresia was increased in the preovulatory follicles of animals that were injected with Flx5 and autopsied at

48h and 120h after treatment with Flx10. In those injected flx5 or flx10, the proportion of follicles with intense mark positive to TUNEL increased at 120h at different stages of development, while the protein Caspase-3 decreased and proteins BAX and that of the receptor 5-HT₇ were not modified.

The results of the present work show that in the prepubescent female rat serotonin participates in the modulation of estradiol synthesis by the ovary and follicular development.

I. INTRODUCCIÓN

La serotonina (5-HT) en el Sistema Nervioso Central (SNC) es un neurotransmisor. En el hipotálamo modula la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de las gonadotropinas por la hipófisis. En órganos periféricos como el ovario es un neuromodulador [1] que participa en la regulación de la esteroidogénesis [2] y posiblemente en el desarrollo folicular [3]. La fuente de 5-HT en el ovario son los mastocitos, las plaquetas y la síntesis *de novo* [4,5]. En el folículo ovárico de ratón se han identificado marcadores del sistema serotoninérgico. En el complejo cumulus-ovocito, las enzimas triptófano hidroxilasa y monoamino oxidasa que intervienen en la síntesis y metabolismo de la 5-HT; en las células de la granulosa los receptores a serotonina 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇; en el ovocito el 5-HT₁ y 5-HT₇ [5]. Estas evidencias sustentan la idea de que la 5-HT es un regulador local en el ovario.

A la 5-HT se le ha asociado con procesos de proliferación, maduración y muerte por apoptosis en diferentes tipos celulares como las neuronas [6]. La apoptosis es un proceso de muerte celular activo y estrictamente regulado en el que participan diferentes proteínas, como la proteína apoptótica Bax y antiapoptótica Bcl-2, así como una familia de proteasas, las caspasas, entre las que se encuentran las caspasas iniciadoras (8 y 9) y efectoras (3 y 7). Las caspasas se sintetizan como precursores inactivos que se convierten en su forma activa por ruptura proteolítica. La activación en secuencia de una caspasa por otra, desencadena una cascada que conduce a la degradación del ácido desoxirribonucleico (ADN) y a la muerte de la célula [7].

En las neuronas, la unión de 5-HT al receptor 5-HT₁ [6] o la activación de los receptores 5-HT₁ y 5-HT₇ en monocitos [8] previene la apoptosis e inhibe la actividad de la caspasa 3, mientras que la estimulación del receptor 5-HT₂ la induce [9]. En el miocardio, la activación del receptor 5-HT₂ induce la apoptosis y disminuye la proteína antiapoptótica Bcl-2 [10]. En neuronas corticales, el neurotóxico de las terminales serotoninérgicas, el 3,4-metienedioximetanfetamina vía el receptor 5-HT_{2A} induce apoptosis y activa la caspasa 3 [11]. Estas evidencias en conjunto sustentan que la participación de la 5-HT en la apoptosis se asocia con el tipo de receptor que se activa.

En el ovario, la apoptosis de las células de la granulosa, teca y del ovocito conduce a la atresia o degeneración del folículo ovárico [12]. En este compartimento de la gónada se han identificado marcadores de la apoptosis, las proteínas Bcl-2 y Bax [5] y las caspasas [13]. En los folículos

sanos se expresa la proteína anti-apoptótica, Bcl-2 y en los atrésicos predomina la proteína proapoptótica Bax y la presencia de la caspasa-3 activa [14,15]. El desarrollo y atresia del folículo ovárico es dependiente de señales endocrinas, hormona estimulante del folículo (FSH) y por factores intraováricos como el estradiol.

Conforme el folículo crece adquiere la capacidad de sintetizar estradiol que junto con la FSH promueve la división de las células de la granulosa y disminuye la atresia de los folículos [12,14,16]. Se ha mostrado que la deficiencia en la producción de estas hormonas conduce a la apoptosis de las células foliculares [16]. En los folículos atrésicos disminuye la producción de estradiol [3,16], hormona indispensable para la sobrevivencia de las células de la granulosa. En la rata hembra prepúber de 25 días de edad, la administración de citrato de clomifeno (antagonista competitivo de los estrógenos), disminuye la concentración de estradiol y se incrementa la proteína Bax en las células de la granulosa del cumulus [17]. Estas evidencias sustentan que el estradiol es esencial en la sobrevivencia de las células de la granulosa y actúa como inhibidor de la apoptosis.

No existen reportes que muestren la participación de la 5-HT del ovario como un factor que se asocie con la apoptosis. Diversos trabajos indican que la 5-HT es esencial en la producción de estradiol por el ovario [2,14,16]. Por ello, la disminución en la producción de esta hormona compromete la sobrevivencia de las células del folículo y conduce a la apoptosis. Además, a partir de la identificación de receptores a 5-HT en el folículo ovárico, es posible que la 5-HT al unirse a estos receptores participe directamente en el control de la proliferación celular y apoptosis en el folículo. En relación a esto, nuestro grupo de trabajo observó que en la rata hembra prepúber de 30 días, la administración de sulfato de 5-HT en la bursa del ovario disminuye la concentración de estradiol, esto se acompaña del aumento del número de folículos preovulatorios con células de la granulosa en apoptosis [18] (datos no publicados).

Con base en estas evidencias es factible pensar que sustancias con actividad serotoninérgica puedan generar la muerte por apoptosis de las células foliculares y comprometer así el desarrollo del folículo ovárico, lo que se resultará en problemas de fertilidad.

Con base en las evidencias expuestas mostramos que la 5-HT y algunos marcadores del sistema serotoninérgico se encuentran en el ovario y actúa como un regulador intraovárico de la síntesis de estradiol, hormona que mantiene la sobrevivencia de las células de la granulosa y como

consecuencia modula el desarrollo del folículo ovárico. Actualmente se propone que funciona como un inductor de la apoptosis en diversos tejidos. Sin embargo, desconocemos aún si la 5-HT actúa directamente en el folículo ovárico e induce la apoptosis y si esta acción es mediada por los receptores 5-HT₁, 5-HT_{2A} o 5-HT₇ presentes en la gónada. Por ello en el presente trabajo consideramos de gran relevancia analizar el papel de la 5-HT del ovario en algunos marcadores de la apoptosis en el folículo, la proteína proapoptótica Bax, y la caspasa 3. Se utilizó como modelo de estudio a la rata hembra prepúber de 30 días de edad.

II. OBJETIVOS

II.1 Objetivo General

Evaluar en la rata hembra prepúber el efecto de la inhibición del sistema serotoninérgico mediante la administración de p-Cloroanfetamina, o su estimulación por fluoxetina en el desarrollo folicular, la expresión de la caspasa 3, la proteína Bax, y del receptor a serotonina 5-HT₇.

II.2 Objetivos Particulares

1. Identificar el receptor 5-HT₇ en los componentes del ovario de la rata prepúber.
2. Evaluar los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico mediante la administración de p-Cloroanfetamina, o su estimulación por fluoxetina en el ovario en:
 - La presencia de la caspasa 3 activa
 - Expresión de la proteína Bax
 - Expresión del receptor 5-HT₇.

III. ANTECEDENTES

III.1 Serotonina

La 5-HT se descubrió hace más de 60 años, sin embargo, el estudio sobre esta indolamina continúa aportando nuevos conocimientos sobre los sistemas cardiovascular, pulmonar, gastrointestinal, genitourinarios, así como el sistema nervioso [19].

La 5-HT o 5-hidroxitriptamina es una amina biogénica, que se sintetiza a partir del aminoácido triptófano. Este por acción de la enzima triptófano hidroxilasa se transforma en 5-hidroxitriptofano (5-HTP). A partir del 5-HTP, la enzima aromático descarboxilasa forma la 5-hidroxitriptamina (5-HT). La triptófano hidroxilasa es la enzima limitante debido a que tiene poca afinidad por otros aminoácidos y porque su distribución está limitada a los tejidos que contienen 5-HT (Figura 1) [20,21].

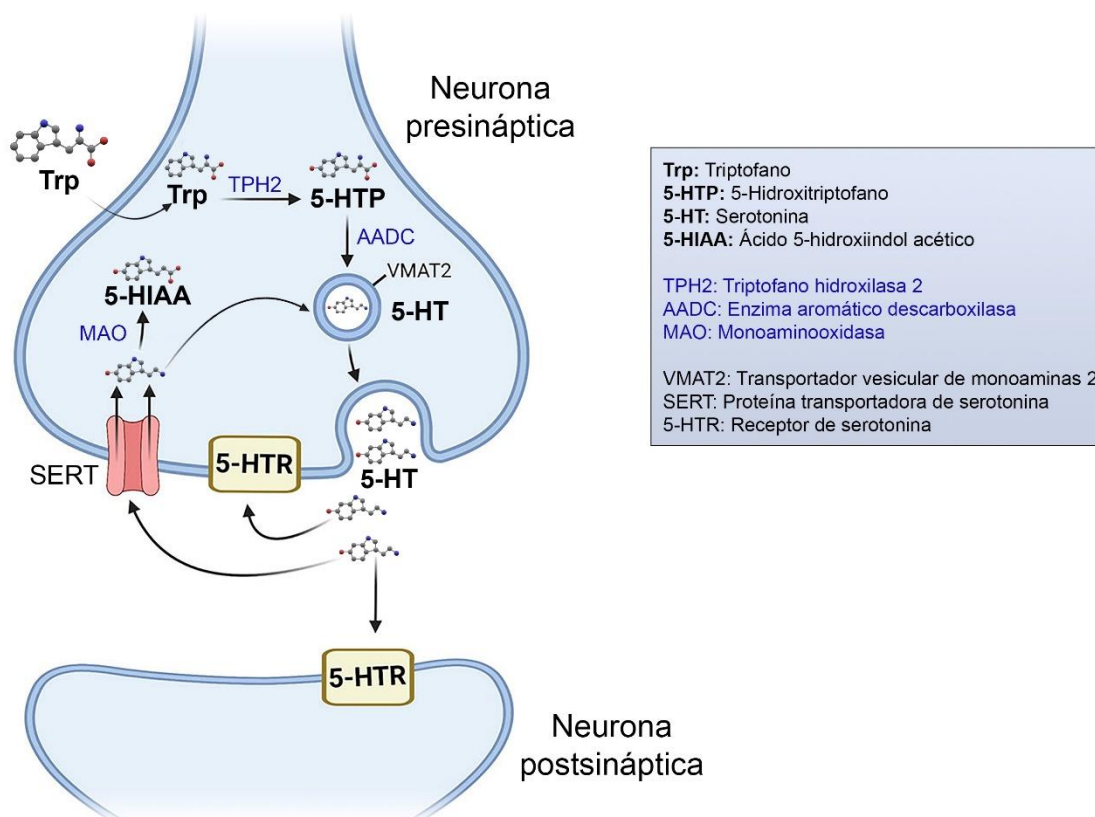


Figura 1. Biosíntesis de 5-HT y enzimas involucradas en el proceso. Modificado de Layunta et al, 2021 [22].

En el SNC, la 5-HT se sintetiza y almacena en neuronas presinápticas (serotoninérgicas y en la glándula pineal). El núcleo del rafe, que se divide en rafe dorsal (NRD), medial (NRM) y del puente (NPP) contiene neuronas serotoninérgicas que proyectan sus fibras de forma ascendente hacia el cerebro anterior y descendentes hacia la médula y el cordón espinal (Figura 2). Un número reducido de neuronas serotoninérgicas también están presentes en la formación reticular [19,20].

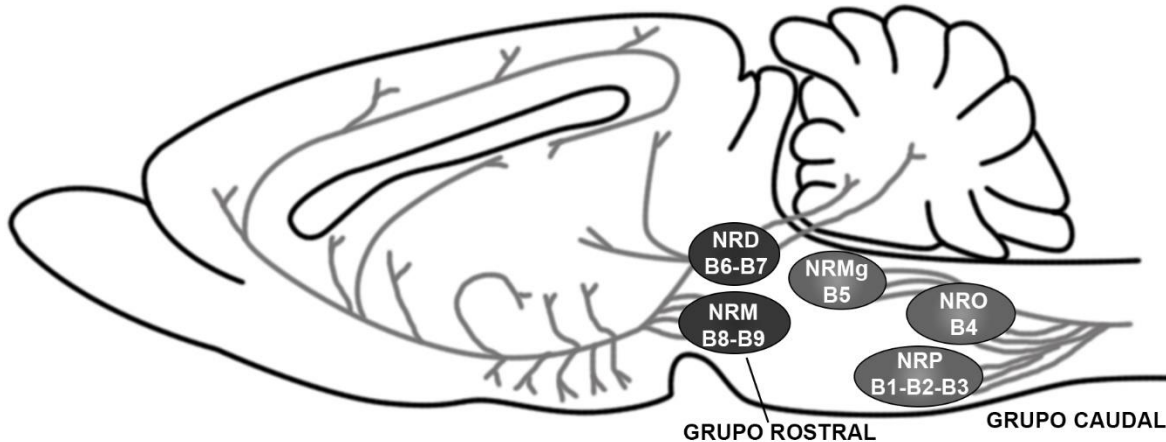


Figura 2. Vista sagital del cerebro de rata donde se muestran los grupos de células que sintetizan 5-HT. NRD núcleo del rafe dorsal, NRM núcleo del rafe medial, NRMg núcleo del rafe magnus, NRO núcleo del rafe oscuro, NRP núcleo del rafe pálido. Modificado de Pierucci et al., 2014 [23].

Fuera del SNC la síntesis de 5-HT se lleva a cabo principalmente en las células enterocromafines del tubo digestivo y en menor proporción en las plaquetas. Estas son el principal sitio de almacenamiento de 5-HT, tienen la capacidad de capturar la 5-HT del plasma, por lo que la concentración de 5-HT que circula en el plasma es baja [19,24].

La concentración de 5-HT en tejidos depende de su tasa de síntesis y metabolismo. La 5-HT es metabolizada por la monoaminoxidasa (MAO), esta enzima existe en dos formas MAO-A y MAO-B. La 5-HT es inactivada principalmente por la MAO-A, y en menor proporción por la MAO-B que es la forma predominante en las plaquetas. Los sitios con mayor actividad de la MAO son el cerebro, el tracto gastrointestinal, pulmones, hígado y plaquetas [25].

Existen otras dos rutas metabólicas que se llevan a cabo en menor proporción, la glucuronidación y sulfatación, que ocurren en el hígado, pulmones, riñones y cerebro. Una ruta alternativa del metabolismo para la 5-HT es su conversión a melatonina en la glándula pineal [26].

En el SNC la 5-HT es liberada a la hendidura sináptica como resultado de la despolarización de la neurona, y se une a sus receptores post-sinápticos o autoreceptores en la membrana presináptica. La unión de la 5-HT a sus autoreceptores vía un mecanismo de retroalimentación negativa impide que se libere más 5-HT a la hendidura sináptica. La proteína transportadora de 5-HT (SERT) que se localiza en la membrana presináptica es la encargada de remover la 5-HT de la hendidura sináptica y la transporta al interior de la neurona presináptica donde se almacena en vesículas presinápticas e impide que sea metabolizada [19,20].

La 5-HT participa en la regulación de diversas funciones fisiológicas, incluido el estado de ánimo, comportamiento social y sexual, el apetito, la digestión, el sueño y la memoria. Por lo tanto, las concentraciones extracelulares de 5-HT requieren ser reguladas. El desequilibrio en el sistema serotoninérgico produce trastornos de la conducta, que incluyen ansiedad, depresión, mal humor, disfunción sexual, compulsividad o déficit cognitivo [27].

III.1.1 Receptores a serotonina

Los efectos de la 5-HT son mediados por sus receptores que se han identificado y clonado [21].

Se han identificado siete familias de receptores a 5-HT (5-HT₁₋₇), clasificados de acuerdo a sus características estructurales, transduccionales y farmacológicas. Algunos de estos receptores presentan heterogeneidad, por lo que se subdividen en 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, etc. Seis de las siete familias de receptores están acoplados a proteínas G, y el receptor 5-HT₃ es el único que se une a canales iónicos Na⁺/K⁺ (Tabla 1) [28,29].

Los receptores 5-HT₁ y 5-HT₃ están asociados negativamente a la adenilato ciclasa, la activación de estos receptores regula de forma negativa al AMPc. El receptor 5-HT₂ regula positivamente las vías del inositol trifosfato y diacilglicerol resultando en la liberación de Ca²⁺ intracelular. Los receptores 5-HT₄ y 5-HT₇ incrementan la actividad de la adenosina monofosfato cíclica (AMPc). Los canales de Na⁺/K⁺ asociados con el receptor 5-HT₃ conducen a la despolarización de la membrana plasmática [29,30].

En el ovario del ratón se han identificado en las células de la granulosa los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇, y en el ovocito el 5-HT₁ y 5-HT₇ [5].

Tabla 1. Tipos de receptores a 5-HT y mecanismo de acción [31]

Familia de receptores	Miembros	Tipos de receptor	Mecanismo de acción	Efecto sobre la célula
5-HT ₁	5-HT _{1A} , 5-HT _{1B} , 5-HT _{1D} , 5-HT _{1E} , 5-HT _{1F}	Acoplado a proteína G _{i/o}	↓ la concentración intracelular de AMPc	Inhibidor
5-HT ₂	5-HT _{2A} , 5-HT _{2B} , 5-HT _{2C}	Acoplado a proteína G _q	↑ el IP3 y el DAG intracelular	Exitador
5-HT ₃	5-HT _{3A} , 5-HT _{3B}	Permite la entrada de Na ⁺ y K ⁺	Despolariza la membrana	Exitador
5-HT ₄	5-HT _{4A} , 5-HT _{4B} , 5-HT _{4C} , 5-HT _{4D} , 5-HT _{4E} , 5-HT _{4F} , 5-HT _{4G} , 5-HT _{4H}	Acoplado proteína G _s	↑ la concentración intracelular de AMPc	Exitador
5-HT ₅	5-HT _{5A} (Solo en humanos)	Acoplado a proteína G _{i/o}	↓ la concentración intracelular de AMPc	Inhibidor
5-HT ₆	Solo hay uno	Acoplado a proteína G _s	↑ la concentración intracelular de AMPc	Exitador
5-HT ₇	Solo hay uno	Acoplado a proteína G _s	↑ la concentración intracelular de AMPc	Exitador

Gi/o: Proteínas Gi que contiene una subunidad α_i o α_o y actúan inhibiendo a la adenilato ciclasa; Gq: Proteínas Gq que contienen una subunidad α_q y actúan activando la fosfolipasa C; Gs: Proteínas Gs que contienen una subunidad α_s y actúan estimulando a la adenilato ciclasa; IP3: Inositol trifosfato; DAG: Diacilglicerol; AMPc: Adenosin monofosfato cíclico; Na⁺: Ion sodio; K⁺: Ion potasio.

Receptores 5-HT₁. La subfamilia de receptores 5-HT₁ está conformada por 5 subtipos, 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E} y 5-HT_{1F}, los cuales comparten secuencia en un 41-63% y se acoplan preferencialmente a proteínas Gi/o e inhiben la formación del AMPc. Los autorreceptores de serotonina en los mamíferos son todos miembros de la familia de receptores 5-HT₁ [29].

Los receptores 5-HT_{1A} se encuentran en las áreas límbicas del cerebro, el hipocampo, el tabique lateral, las áreas corticales y también en NRD y MRM, y en menor proporción en los ganglios

basales y el cerebelo [32]. El receptor 5-HT_{1D} se encuentra en el ovocito, y se le asocia con la regulación del desarrollo del ovocito [5].

Receptores 5-HT₂. Estos receptores se acoplan preferentemente a la proteína G del tipo Gq/11 y activan la hidrólisis de los fosfatos de inositol y aumentan las concentraciones de calcio citosólico. Se han clonado tres receptores 5-HT₂, los cuales presentan una similitud en su secuencia del 46%-50%. El receptor 5-HT_{2A} fue el primer receptor identificado de este subgrupo y se describió como el receptor 5-HT_D. El receptor 5-HT_{2B} media la acción contráctil de la 5-HT. El tercer subtipo de es el receptor 5-HT_{2C}, que se describió inicialmente en el plexo coroideo como receptor 5-HT_{1C}, y posteriormente fue reclasificado como 5-HT_{2C} [29].

La activación de los receptores 5-HT_{2A} se asocia con las respuestas contráctiles en el músculo liso vascular, en el músculo liso bronquial, uterino y urinario, y forman parte de los efectos contráctiles de 5-HT en el íleon del cobayo, la agregación plaquetaria y el aumento de la permeabilidad capilar [29,32].

Receptores 5-HT₃. Esta subfamilia incluye cinco receptores (5-HT_{3A-D}) y funciona como un canal iónico regulado por ligando, similar a la acetilcolina o los receptores GABA. Los receptores 5-HT₃ se expresan en neuronas de origen central y periférico, así como en el tubo digestivo y participan en procesos gastrointestinales, como la motilidad, la absorción y la secreción intestinales, y la liberación de 5-HT de las células enterocromafines; en el cerebro, los receptores 5-HT₃ están relacionados con la cognición. Desencadenan la rápida despolarización debido a una corriente de entrada transitoria, posterior a la apertura de canales de cationes no selectivos (afluencia de Na⁺, Ca⁺⁺, salida de K⁺). La disfunción de la familia 5-HT₃ está involucrada con algunos trastornos cerebrales, que incluyen psicosis, ansiedad y trastornos alimentarios [29,31].

Receptores 5-HT₄. Se expresan principalmente en el intestino y participan en la motilidad y secreción intestinal. Esta subfamilia de receptores estimula a la adenilato ciclasa [31].

Receptores 5-HT₅. Son los menos estudiados, se han identificado dos subtipos funcionales en roedores que se expresan exclusivamente en el sistema nervioso: 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}. En humanos, el gen que codifica el subtipo 5-HT_{5B} incluye codones de terminación que lo hacen no funcional. Estos receptores pueden estar involucrados en procesos como el control motor, la alimentación,

la ansiedad, la depresión, el aprendizaje, la consolidación de la memoria, la conducta adaptativa y el desarrollo del cerebro [31,32].

Receptores 5-HT₆. Esta subfamilia de receptores ha sido poco estudiada. En ratones han destacado que puede ser importante en la fisiología del tracto gastrointestinal. En el SNC, este receptor está implicado en trastornos mentales, como la psicosis, y en la cognición y el aprendizaje. Se han descrito dos variantes del receptor 5-HT₆. El receptor 5-HT₆ completo está compuesto por 440 residuos de aminoácidos y se localiza predominantemente en las zonas cerebrales límbica y extrapiramidal. La segunda variante (probablemente el resultado de la eliminación de 286 residuos de aminoácidos) se expresa principalmente en caudatum y substantia nigra [29,31].

Receptores 5-HT₇. Los receptores 5-HT₇ se expresan en el músculo liso vascular y no vascular y en el SNC. El receptor 5-HT₇ se expresa en el tálamo, el hipocampo, el hipotálamo, áreas corticales amígdala, el tronco encefálico, ganglios basales, y el cerebelo. Los receptores 5-HT₇ regulan la relajación en el íleon del cobayo y la vena safena del gato, y también induce el aumento de la concentración de AMPc y la relajación en la vena cava porcina neonatal. Este receptor se expresa en vasos sanguíneos y es responsable de la respuesta vasodilatadora a la 5-HT [29,33]. También se encuentra en las células de la granulosa humana, y se asocia con la producción de progesterona. En el ratón, se expresa en las células del cumulus y en el ovocito. Se sugiere que participa en las etapas iniciales de la maduración del ovocito [5].

III.1.2 Serotonina y el eje Hipotálamo-Hipófisis

La 5-HT en el SNC cumple diversas funciones, las proyecciones de los NRD y NRM participan en la regulación de la temperatura, el apetito, los ciclos de sueño, la emesis y el comportamiento sexual, mientras que las proyecciones del NRP (magnus, pontis y reticularis) participan en la nocicepción y el tono motor [34].

En el hipotálamo se encuentran las neuronas productoras de la GnRH, que regula la secreción de las gonadotropinas [FSH y hormona luteinizante (LH)]. Las neuronas GnRHérgicas se localizan en el área preóptica del hipotálamo anterior y en el área medio basal, y es liberada hacia los vasos del sistema porta-hipotálamo-hipofisarios [35].

Los axones de las neuronas productoras de 5-HT, que se originan en los NRD y NRM, hacen sinapsis con las neuronas productoras de la GnRH. En estas neuronas y en la línea de células inmortalizadas GT1-7 se expresan los receptores a 5-HT (5-HT₁ y 5-HT₂) [36,37]. Con base en estas evidencias se propone que la 5-HT modula la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas esenciales en la regulación de la fisiología del ovario. [36].

La información que apoya la participación de la 5-HT en la regulación de la secreción de las gonadotropinas es contradictoria. Se reporta que en el hipotálamo medio basal, la 5-HT inhibe la secreción de la GnRH, mientras que en el área preóptica tiene un efecto estimulante [38].

Además, la participación de la 5-HT en la regulación de la secreción de las gonadotropinas es diferente entre la rata hembra y macho, y varía con la edad o con el tipo de receptor a 5-HT que se active. En la hembra estimula la secreción de LH sin afectar la de FSH [39]. Mientras que en la rata macho, la 5-HT estimula la secreción de FSH y no modifica la de LH [38,40].

La administración del precursor de 5-HT, el 5-hidroxitriptofano (5-HTP), a ratas prepúberes de 16 y 18 días de edad, aumentó la concentración de 5-HT en el hipotálamo, y de LH en el suero. Cuando este mismo tratamiento se aplicó a ratas de 25 a 30 días de edad no se modifica LH, y en las hembras de 35 a 40 días de edad, disminuye la concentración de LH en el suero [41,42]. Cuando se perfunde el hipotálamo con 5-HT aumenta la liberación de la GnRH a los 14 días, mientras que a los 30 días no la modifica (Arias et al., 1990). En estudios *in vitro* con eminencia media e hipófisis de la rata hembra en proestro, la perfusión de diferentes concentraciones de 5-HT (0.06, 0.6 y 6 µmol/L) induce la liberación de LH y la FSH, este efecto no se observa cuando se perfunde únicamente la hipófisis. Estas evidencias permitieron a los autores proponer que la 5-HT modula la secreción de LH vía su acción en el hipotálamo al actuar directamente en las terminales de las neuronas productoras de GnRH [41–44].

Cuando a ratas prepúberes de 16 días se les inyecta 5-HT directamente en el hipotálamo, se bloquea la liberación de la LH [41]. La inyección del agonista de los receptores 5-HT₁, el 8-hidroxi-(2-N,N-dipropilamino)-tetralina, estimula la secreción de la LH [45]. Cuando las neuronas GnRHérgicas de ratones en proestro se mantienen *in vitro* y se activan los receptores 5-HT₁, se inhibe la liberación de la GnRH, mientras que la activación de los receptores 5-HT₂ la estimula [36]. Estas evidencias sustentan que la 5-HT modula la secreción de las gonadotropinas, y que su efecto depende del receptor a 5-HT que se estimule.

Los lóbulos anterior y medio de la hipófisis reciben innervación serotoninérgica que penetra a esta glándula junto con los vasos sanguíneos, por lo que se propone que la amina regula el flujo sanguíneo hacia la glándula [46]. En el lóbulo anterior de la hipófisis la serotonina es recapturada por las terminales de las neuronas serotoninérgicas y es almacenada en los gonadotropos, lo anterior llevó a proponer que la 5-HT regula la liberación de las gonadotropinas al actuar directamente en la hipófisis [47].

Conjuntamente las evidencias antes indicadas muestran que la 5-HT regula el eje hipotálamo-hipófisis-gonada.

III.2 Estructura y funciones del ovario

En los mamíferos, el ovario es una estructura conformada por compartimentos, que cumplen diferentes funciones. En el ovario se almacenan y desarrollan los ovocitos. Su principal función es la maduración del ovocito, contenido en el folículo ovárico [48,49]. El folículo ovárico crece y se diferencia desde un folículo primordial hasta alcanzar la etapa de folículo preovulatorio, el cual libera al ovocito al momento de la ovulación [50]. En el ovario se encuentran las células secretoras de hormonas esteroideas sexuales femeninas, que favorecen el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios en la hembra [51].

En el ovario se identifican estructuralmente cuatro capas: el epitelio cúbico, la túnica albugínea, una región cortical y la región medular. La capa más externa del ovario es la epitelial, conformada por un epitelio de células cubicas o aplanadas, que se originan del mesotelio del peritoneo visceral. Por debajo de esta capa se encuentra la túnica albugínea, que está conformada por tejido conectivo denso. Enseguida, se encuentra la corteza, que está formada por un estroma celular en el cual se encuentran los folículos ováricos en diferentes estados de maduración [52]. Cada folículo está formado por una o más células somáticas que rodean un ovocito. En esta zona es donde se mantienen los ovocitos, en la profase I de la meiosis, hasta que uno o varios de ellos reinician la meiosis, lo cual sucede durante cada ciclo estral [50,53]. La capa más interna del ovario es la médula, aunque esta no tiene un límite definido con la corteza. Está formada por tejido fibroelástico laxo, contiene numerosos vasos sanguíneos, linfáticos y fibras nerviosas, los cuales entran y salen del ovario por una zona denominada hilio [52,54].

III.2.1 Esteroidogénesis

Una de las funciones del ovario es la producción de hormonas esteroides sexuales a partir del colesterol. Estas hormonas regulan el crecimiento y diferenciación de tejidos, como el útero, las glándulas mamarias, el cerebro y el esqueleto. Las hormonas esteroides también actúan de forma local en el ovario, y mantienen su estructura y funcionamiento [48,55].

En el ovario, las principales células productoras de hormonas esteroides son las células de la teca, de la granulosa y luteales, en donde se expresan las enzimas que participan en la síntesis de hormonas esteroides [56].

Las hormonas esteroides se forman a partir del colesterol, que se obtiene de tres fuentes: 1) de lipoproteínas circulantes en la sangre, 2) a partir de la síntesis de novo, y 3) de los esteres de colesterol almacenados en la célula. Las células productoras de hormonas esteroides obtienen el colesterol de lipoproteínas de baja o de alta densidad (LDL y HDL respectivamente) que entran a la célula por endocitosis [48,57]. La vascularización de la capa de células de la teca interna del folículo y del cuerpo lúteo facilita la disponibilidad de las lipoproteínas como fuente de colesterol [48,56].

El colesterol es transportado al interior de la célula por endocitosis mediado por receptores asociados a la membrana plasmática. En la célula es transportado a través de la membrana externa de la mitocondria por la proteína reguladora de la respuesta aguda de la esteroidogénesis (StAR) hasta la membrana interna, donde por acción de la enzima P450SCC (CYP11A1) es transformado a pregnenolona al romper la cadena lateral de colesterol (unión C-20-22). Este es el primer paso limitante en la síntesis de hormonas esteroides [51,55].

La pregnenolona abandona la mitocondria y en el retículo endoplásmico liso es transformada a progesterona por acción de la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD). La progesterona es la primera hormona con actividad biológica que es secretada por las células de la teca y en menor cantidad por las células de la granulosa [51,57].

El siguiente paso en la síntesis de hormonas esteroides se lleva a cabo también en el retículo endoplásmico liso, por acción de la enzima 17α hidroxilasa/C-17, 20 liasa (CYP17). Tanto la pregnenolona como la progesterona actúan como sustrato para este complejo enzimático, y dan origen a la dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, respectivamente. La vía de

síntesis de andrógenos a partir de progesterona se conoce como la vía delta 4, mientras que la síntesis a partir de pregnenolona se denomina vía delta 5 [51,56].

Tanto la androstenediona como la testosterona son los precursores en la síntesis de estrógenos, estrona y 17β -estradiol respectivamente, ya que ambas moléculas pueden ser aromatizadas, siendo el 17β -estradiol el de mayor actividad biológica. La aromatización de los andrógenos también se lleva a cabo en la membrana del retículo endoplásmico liso por acción del complejo enzimático P450 aromatasa (CYP19) [48,58]. Las células de la granulosa son la principal fuente de estrógenos. La síntesis de estrógenos requiere de la cooperación entre las células de la granulosa y de la teca y de las gonadotropinas (LH y FSH) [48,51].

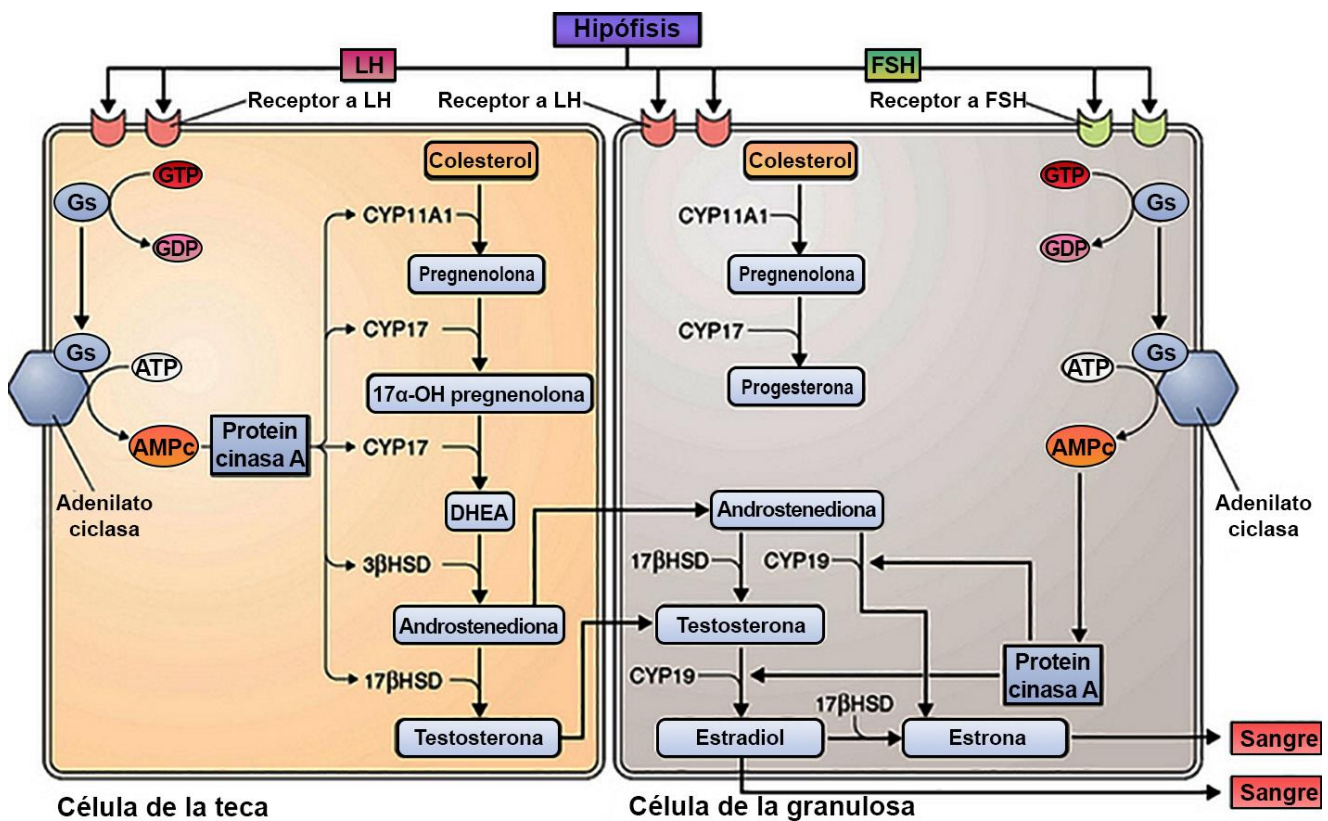


Figura 3. Síntesis de hormonas esteroides en el ovario. Regulación de la producción ovárica de estrógenos, progesterona y andrógenos. La LH actúa sobre las células de la teca; La FSH actúa sólo sobre las células de la granulosa. La FSH y la LH estimulan la adenilato ciclasa al unirse a sus receptores acoplados a proteína G. El monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) generado a partir del trifosfato de adenosina (ATP) activa la proteína cinasa A, que a su vez estimula las enzimas esteroidogénicas. Gs, proteína G; GDP, difosfato de guanosina; GTP, trifosfato de guanosina. Modificado de Gupta y Chia, 2013 [59].

Las células de la teca son estimuladas por la LH para producir andrógenos, mientras que las células de la granulosa son activadas por la FSH para convertir los andrógenos a estrógenos vía la activación de la enzima p450 aromatasa (Figura 3) [48,60].

III.2.2 Desarrollo folicular

Durante el desarrollo embrionario, las células germinales primordiales (PGC) migran a la cresta genital, proliferan y sobreviven en respuesta a proteínas morfogénicas óseas específicas (BMP) y la vía de señalización del ligando cKIT-KIT. En la gónada embrionaria femenina, estas PGC dejan de dividirse y entran en la profase I de la meiosis. Una vez detenidos en esta fase de la meiosis, los ovocitos permanecen inactivos hasta la ovulación [61,62].

En la gónada embrionaria, las PGC forman sincitios (o nidos), estas al separarse son rodeadas por células somáticas progenitoras, “pregranulosas” que se separan del resto del tejido ovárico por una membrana basal, lo que lleva a la formación de folículos primordiales, y se establece la reserva ovárica. La formación de los folículos está regulada por el estradiol y la vía de señalización de los receptores Notch. En la mujer, una vez que los folículos se han ensamblado, no se forman nuevos folículos durante la vida prepuberal o adulta. Por lo tanto, la viabilidad a largo plazo de los ovocitos dentro de los folículos primordiales es fundamental para el éxito reproductivo [62,63].

Los folículos primordiales se forman secuencialmente, los primeros que se forman son los primeros en crecer y esto ocurre incluso antes de que se haya ensamblado el resto de los folículos primordiales [62].

Las células de la teca de los folículos ováricos derivan de las células mesenquimales que migran hacia el ovario desde la región del mesonefros y células estromales WT1+ de la región medular del ovario embrionario [63,64].

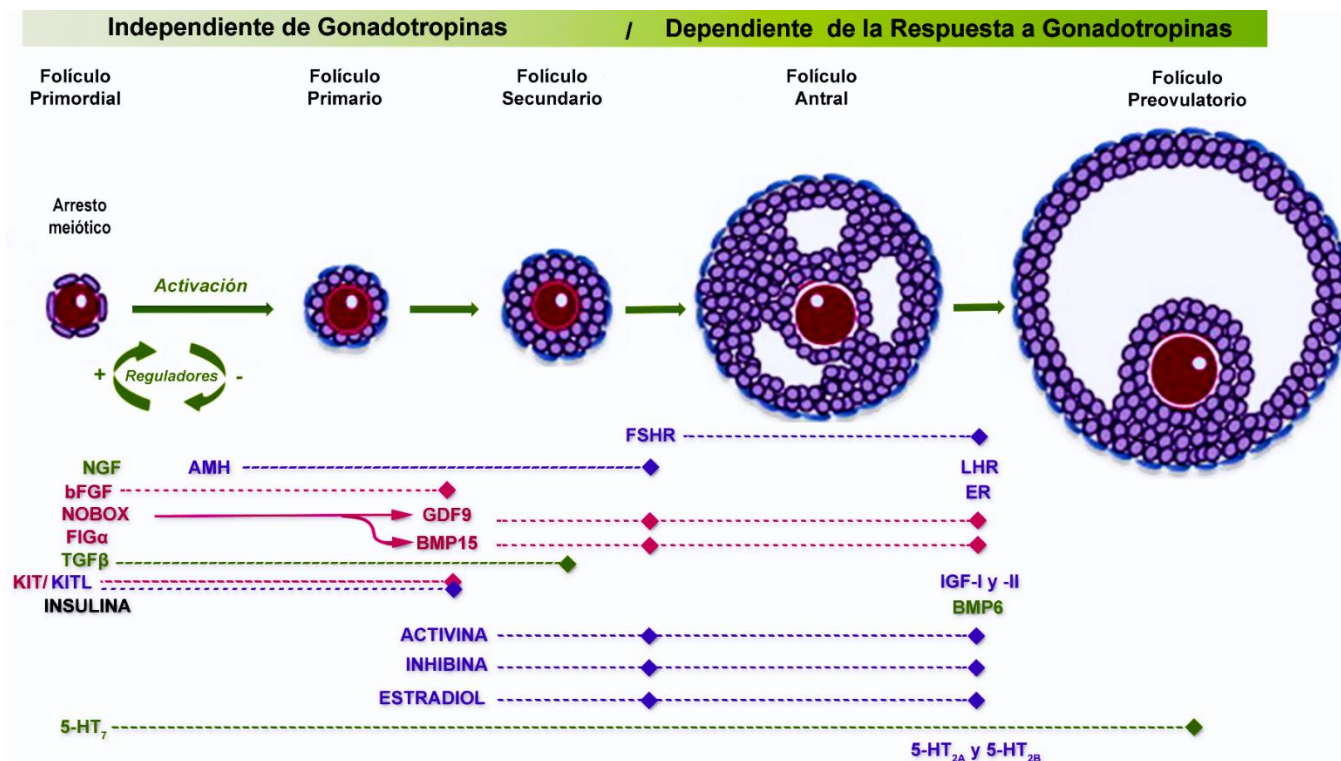


Figura 4. Proceso de folículogénesis y factores que lo regulan. Los factores producidos por las células de la granulosa (en color púrpura), producidos por el ovocito (en color magenta), o en ambos (en color verde), participan y regulan el desarrollo del ovocito y del folículo en cada etapa de la folículogénesis. FSHR, receptor a FSH; LHR, receptor a LH; ER, Receptor a estrógenos; NGF, factor de crecimiento nervioso; AMH, hormona antimülleriana; bFGF, factor de crecimiento fibroblástico básico; NOBOX, genes “homeobox” del ovario de recién nacida; GDF9, factor de crecimiento y diferenciación-9; FIGα, factor de la línea germinal α; BMP15, proteína morfogenética osea 15; TGFβ, factor de crecimiento transformante β; KITL, factor de célula madre; IGF-I y -II, factor de crecimiento parecido a la insulina tipo -I y -II; 5-HT₇, receptor a 5-HT tipo 7; 5-HT_{2A} y 2B, receptores a serotonina del tipo 2A y 2B. Modificado de Sánchez y Smitz, 2012 [65].

La liberación de los folículos primordiales de un estado de reposo a una fase de crecimiento es iniciada por factores intraováricos, como el ligando Kit, que activa el receptor c-KIT y la vía de la fosfatidil inositol 3 cinasa [63,66] e inhibe la transcripción del factor FOXO3 que conduce a la activación del folículo primordial (Figura 4) [63,67].

Conforme los folículos aumentan de tamaño, se desplazan hacia la corteza. Como resultado de las divisiones mitóticas de las células de la granulosa, el folículo primario unilaminar se transforma en secundario o preantral, formado por dos o más capas de células de la granulosa que rodean al ovocito. Estos folículos tienen una red vascular por fuera de la lámina basal, lo que le permite la entrada de factores que se encuentran en la circulación sanguínea [50]. La transición

de folículo preantral a antral temprano es regulado por el factor de diferenciación y crecimiento-9 (GDF-9) y la FSH, por lo que la presencia del receptor a FSH en esta etapa es necesaria para que continúe su desarrollo [68,69].

Durante la proliferación de las células de la granulosa, se desarrolla alrededor del folículo otra capa de células, la teca folicular. La diferenciación de esta capa es un evento clave en las primeras etapas del crecimiento del folículo. La producción del GDF9 por los ovocitos conduce a la diferenciación de las células de la teca en los linajes estromales de fibroblastos y esteroidogénicos [63,64].

Después de la diferenciación de células de la teca, los folículos primarios y secundarios crecen en respuesta a la hormona antimülleriana, un marcador de la reserva folicular que reduce el crecimiento folicular y la activina que favorece el crecimiento folicular [70]. El crecimiento folicular y la diferenciación de las gónadas femeninas dependen de factores de transcripción específicos (FOXL2, GATA4/6, AR), así como de la vía de señalización WNT4/CTNNB1. FOXL2, en particular, favorece la expresión de la aromatasa (Cyp19a1). El factor de transcripción FOXO1 es un regulador esencial para el crecimiento del folículo, la apoptosis y el destino celular [63,71].

A medida que la teca es irrigada, las células expresan los receptores para la LH y la capacidad de sintetizar esteroides. La teca se diferencia en teca interna y externa [53]. Los vasos penetran en la teca externa y dan origen al plexo capilar que irriga a la teca interna. Estos capilares no atraviesan la membrana basal, las capas de células de la granulosa permanecen avasculares durante todo el desarrollo folicular. Como resultado de la vascularización aumenta la exposición del folículo a factores que se encuentran en circulación [50]. A medida que el folículo continúa su desarrollo, se termina de formar la zona pelúcida alrededor del ovocito. Las células de la granulosa mantienen contacto con el ovocito a través de las uniones comunicantes o GAP [50,53].

Conforme el folículo continúa su desarrollo, se forman espacios llenos de líquido. Con el crecimiento del folículo los espacios se unen para formar una cavidad, el antro folicular. En esta etapa del desarrollo el folículo se convierte en terciario o antral [53]. El antro folicular se encuentra rodeado por células de la granulosa mural. En uno de los lados de la granulosa mural se ubica el ovocito rodeado de células conocidas como células de la granulosa del cúmulus, que mantienen comunicación con el ovocito mediante uniones comunicantes [16,63].

Durante la transición de folículo antral a folículo preovulatorio se expresan los receptores a LH en las células de la granulosa, como resultado de la estimulación de la FSH. Este paso es fundamental para que el folículo alcance la ovulación [50].

Los folículos preovulatorios son aquellos que han alcanzado su etapa final de maduración y que tienen la capacidad de liberar su ovocito en el día de la ovulación. En estos folículos la expresión de los receptores a LH presenta un gradiente que disminuye desde las capas más externas de la granulosa hacia las células del cúmulus. En estos folículos las células tienen una baja tasa mitótica y una alta concentración de estrógenos en el fluido folicular [50,63].

III.2.3 Atresia folicular

El desarrollo del folículo ovárico es regulado por diferentes factores endocrinos, paracrinos y autocrinos que actúan de forma coordinada para seleccionar los folículos para la ovulación. Más del 99% del total de folículos no alcanzan la etapa de preovulatorio, en ellos se lleva a cabo un proceso degenerativo, la atresia folicular. Durante este proceso se eliminan tanto las células foliculares como los ovocitos [16,72]. La atresia folicular ocurre desde el momento del desarrollo del ovario fetal hasta el final de la vida reproductiva [62].

La atresia folicular se atribuye principalmente a la muerte celular por apoptosis de las células de la granulosa. La apoptosis de estas células es activada por factores extrínsecos e intrínsecos [72,73]. El estradiol, factores de crecimiento y citocinas, secretados por las células de la granulosa son esenciales para la sobrevivencia de las células de la granulosa y para el desarrollo folicular [73].

Los folículos atrésicos se identifican con base en criterios morfológicos y bioquímicos. Los cambios bioquímicos se manifiestan antes que las alteraciones morfológicas. Entre las características morfológicas que caracterizan a un folículo atrésico están: 1) células de la granulosa picnoticas con mitocondrias y retículo endoplásmico vacuolados; 2) degradación de la membrana basal; 3) invasión de las capas de células de la granulosa por vasos sanguíneos; 4) hipertrofia de la teca; y 5) degranulación de las células de la granulosa hacia el antro folicular [74,75].

El proceso que conduce a la atresia de los folículos primordiales, preantrales y antrales es diferente. En los folículos primordiales, la degeneración del ovocito se lleva a cabo antes que

cualquier cambio en la capa de células de la granulosa. En estos folículos se produce lisis del ovocito, seguida de la eliminación de las células de la granulosa por macrófagos [73,76]. En los folículos preantrales, la degeneración del ovocito también ocurre antes de los cambios morfológicos en los otros componentes del folículo [74]. A diferencia de los folículos primordiales y preantrales, el desarrollo de los folículos antrales se encuentra principalmente bajo el control de las gonadotropinas. Por lo que si un folículo antral ovula o se vuelve atrésico depende de su capacidad para responder a las gonadotropinas, en este tipo de folículos se presenta primero la muerte de las células de la granulosa seguida por la degeneración del ovocito [16,77].

III.2.4 Apoptosis en el ovario

La muerte celular es un proceso que mantiene la homeostasis en cualquier organismo. Aún existe controversia sobre cuantos tipos de muerte celular existen. De forma general se distinguen dos tipos de muerte celular, una programada (apoptosis) y una “espontanea” (necrosis) [78], sin embargo existen mecanismos de muerte celular que comparten características de necrosis y apoptosis o bien no tienen todas las características de necrosis o apoptosis. Tal es el caso de la oncosis, necroptosis, paraptosis y piroptosis, entre otras [79].

La apoptosis es la muerte celular que se acompaña de balonamiento de la célula, retracción de pseudópodos, disminución del volumen celular (picnosis), condensación de la cromatina, fragmentación del núcleo (cariorrhexis), formación de vesículas a partir de la membrana citoplasmática que envuelve a los organelos, manteniéndolos funcionales hasta las últimas etapas de la muerte celular. La fragmentación del ADN en segmentos de 180-200 pb frecuentemente se utiliza como un marcador de la apoptosis, así como la activación de las caspasas, necesarias para activar este tipo de muerte celular [7,78].

La atresia folicular es el resultado de la muerte por apoptosis de las células de la granulosa. La atresia se clasifica de acuerdo a su fenotipo en tres tipos. El primero se conoce como “atresia antral”, en el cual la apoptosis inicia en las capas intermedias de la granulosa, y avanza hacia las células más cercanas a la cavidad antral. El segundo tipo es la “atresia basal”, que se presenta en los folículos antrales pequeños, y la apoptosis ocurre en las células de la granulosa próximas a la lámina basal, en estos folículos las células de la granulosa se luteinizan de forma prematura y comienzan a producir progesterona, sin embargo, no culminan el proceso de

luteinización y mueren por apoptosis. La tercera forma de atresia, “apoptosis de diferenciación terminal” se presenta en folículos preovulatorios, las células de la granulosa se desprenden de las capas más próximas al antro folicular y forman glóbulos que se agregan y flotan en el líquido antral. La mayor parte de los folículos presentan muerte de células de la granulosa del tipo “atresia antral” [80,81].

Diferentes vías activan la apoptosis en las células de la granulosa. La primera es el resultado del aumento en la concentración del AMPc, inducida por factores de crecimiento y gonadotropinas vía la granzima B. La segunda se denomina “extrínseca”, y es activada por receptores de muerte cuyos ligandos son el factor de necrosis tumoral alfa ($TNF\alpha$) y el ligando Fas. La tercera o “intrínseca” es mediada por la mitocondria a través de la activación de miembros de la familia Bcl-2. La activación de cualquiera de estas tres vías tiene como resultado la fragmentación del ADN inducido por las caspasas (Figura 5) [80,82].

Las caspasas son una familia de cisteína proteasas que escinden proteínas después de un residuo de ácido aspártico. Son sintetizadas como proenzimas inactivas, se activan por escisión autocatalítica o por la acción de otras proteasas [78]. Existen diferentes sustratos para las caspasas: poli (ADPribosa) polimerasa (PARP), proteína cinasa dependiente de ADN (DNA-PK), ribonucleoproteína U1-70 y componentes del citoesqueleto, como actina, fodrina y laminina. Las caspasas se dividen en “iniciadoras” entre las que se encuentran la caspasa 8 y 9 y las “efectoras” que son la 3, 6 y 7. La caspasa-3 tiene un papel central en la ejecución del programa apoptótico, y es activada por la caspasa-8 (vía extrínseca) y la caspasa-9 (vía intrínseca). En la apoptosis, las caspasas efectoras activas conducen a la muerte de las células, por ello se propone que la activación de la caspasa-3 podría estar implicada en la atresia folicular [83].

Uno de los principales factores inductores de la apoptosis en las células foliculares es el estrés oxidativo. El aumento de estrés oxidativo puede modular la relación Bax/Bcl2, aumentando la expresión de Bax, y la producción de especies reactivas de oxígeno las cuales pueden inducir la despolarización de la membrana de la mitocondria. El cambio en el potencial de la membrana mitocondrial permite la traslocación de Bax a la membrana de la mitocondria y la liberación de proteínas del espacio intermembranal, como el citocromo c, al citoplasma. Las proteínas proapoptóticas de la familia Bcl-2, conocidas como BH3, actúan como reguladores de la apoptosis en el ovario. Las proteínas BH3 son el vínculo entre las vías intrínseca y extrínseca.

La proteína BID truncada (tBID) asociada a la caspasa 8 (vía extrínseca) induce la sobreexpresión de Bax y estimula la liberación del citocromo c de la mitocondria (vía intrínseca). El citocromo c se une al factor activador de la proteasa-1 (APAF1) en el citoplasma de la célula y activa la caspasa-9, y como consecuencia la procaspasa-3 se convierte a caspasa-3. Esta caspasa-3 activada escinde la proteína activadora de la DNAsa-1 y estimula a la DNAsa que fragmenta el ADN en 180-200 pares de bases característicos de la apoptosis [82,83].

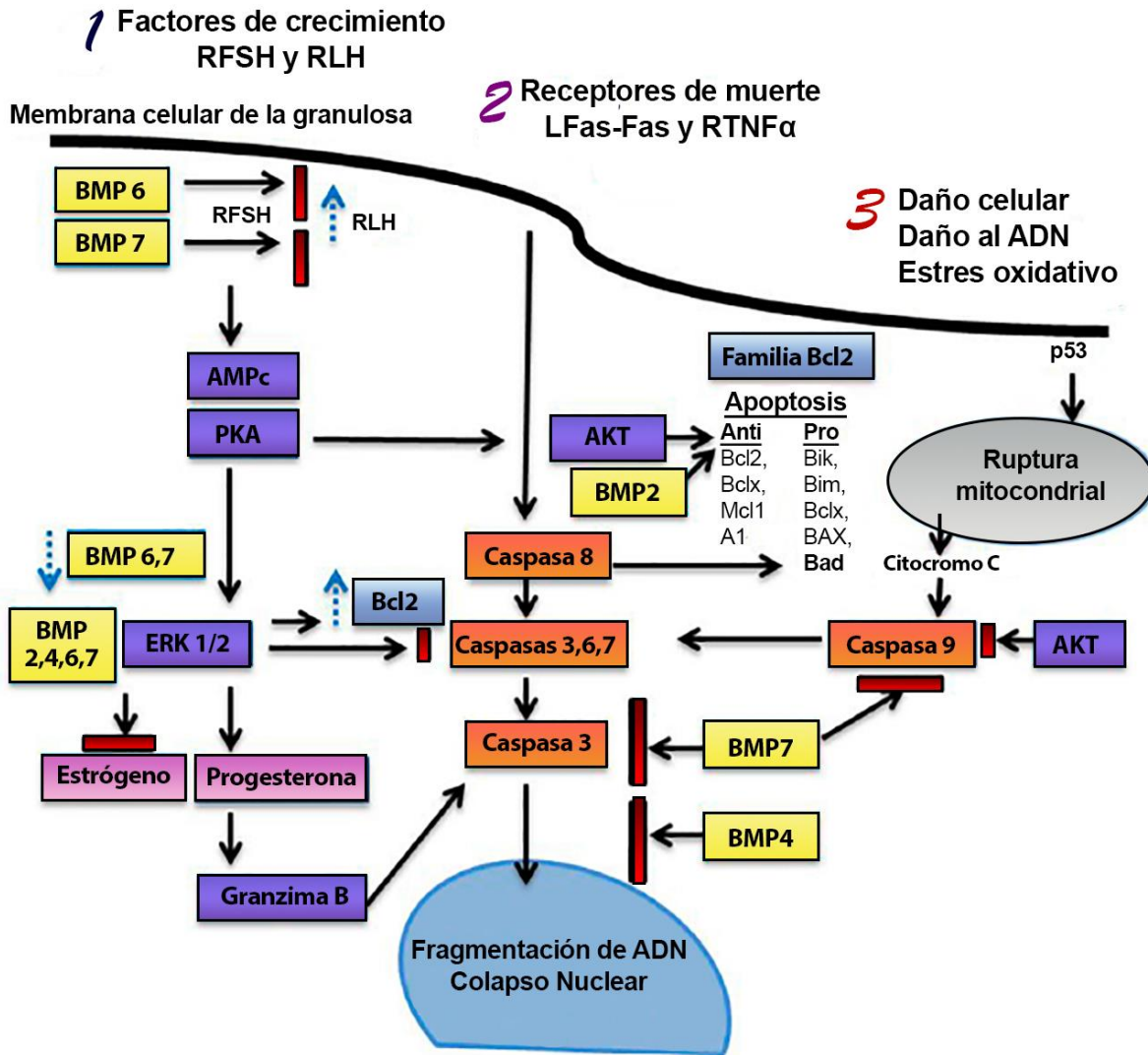


Figura 5. Vías de señalización de la apoptosis. Representación de las tres vías de inducción de la apoptosis: 1. factores de crecimiento, 2. receptores de muerte y 3. daño celular. BMP, proteína morfogenética osea; AMPc, adenosin monofosfato cíclico; PKA, proteína cinasa A; RFSH, receptor a FSH; RLH, receptor a LH; AKT, proteína cinasa B; ERK, cinasa regulada por factores extracelulares. Modificado de Regan et al., 2018 [80].

La familia de receptores del factor de necrosis tumoral, Fas y el factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1), se unen a sus ligandos (FasL y TNF α) para iniciar la vía apoptótica mediada por el receptor de muerte. El aumento de FasL ocasiona la trimerización del receptor y el reclutamiento de la proteína que contiene el dominio de muerte asociado a Fas (FADD). El FADD convierte la procaspasa-8 en caspasa-8. Una vez activada, la caspasa-8 el BID se convierte en tBID que activa la caspasa-3 para inducir la apoptosis de las células foliculares [14,78].

La muerte celular por apoptosis puede ser iniciada por factores extrínsecos e intrínsecos, como son el daño en el ADN y estrés oxidativo, que activan vías de señalización específicas de p53 para desencadenar mecanismos apoptóticos. También existen factores que tienen actividad antiapoptótica, como el factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), el factor de crecimiento epidérmico (EGF) y el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), así como las gonadotropinas (FSH y LH), que favorecen la sobrevivencia del folículo [12,68,80].

Los principales factores antiapoptóticos de las células de la granulosa son los estrógenos y la progesterona, así como la FSH, LH, EGF, IGF, FGF, prolactina, laminina, leptina y glucocorticoides. La capacidad que tienen los folículos para producir esteroides se correlaciona con la concentración de estas hormonas en el suero y en el líquido folicular de la cavidad antral [61,76,82].

Los estrógenos son indispensables para el crecimiento folicular debido a que inhiben la apoptosis [17]. Antes de la formación de la cavidad antral, los andrógenos del folículo ovárico aumentan la expresión de los receptores para la FSH. La producción de AMPc-PKA inducida por FSH (antiapoptótica) promueve la señalización de ERK1/2, lo que aumenta Bcl-2 y promueve la producción de estrógenos favoreciendo la síntesis de progesterona. También se ha demostrado que los estrógenos al unirse a sus receptores disminuyen la actividad de FasL [14,83].

III.3 Anfetaminas

Las anfetaminas son sustancias psicoactivas con propiedades estimulantes, eufóricas, anoréxicas y, en algunos casos, empatógenas y alucinógenas. Este tipo de sustancias derivan de la estructura central de β -feniletilamina y atraviesan la barrera hematoencefálica. Las características antes mencionadas están presentes en el derivado más simple, la anfetamina. La presencia del grupo α -metilo en la molécula de anfetamina evita la oxidación del grupo amino

por las enzimas monoaminoxidasa (MAO) y aumenta la capacidad de atravesar las membranas [84]. Además, debido a la similitud estructural con las monoaminas que actúan como neurotransmisores, las anfetaminas actúan como sustratos competitivos en los transportadores de membrana de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y 5-HT, disminuyen la recaptura de neurotransmisores endógenos e inducen la liberación retrograda de neurotransmisores al modificar el funcionamiento de la proteína transportadora del neurotransmisor. Las anfetaminas también inducen la liberación de DA y 5-HT de las vesículas donde se encuentran almacenadas e inhiben su absorción en vesículas, lo que resulta en el aumento de las concentraciones del neurotransmisor y aumenta su disponibilidad [85–87].

En el plasma la vida media de las anfetaminas depende principalmente del pH de la orina, ya que la excreción renal es la principal vía de eliminación y aumenta cuando la orina tiene pH ácido y disminuye cuando es alcalino [88,89].

Uno de los principales mecanismos de la toxicidad de las anfetaminas es la hipertermia. La incidencia y la gravedad de la hipertermia varían entre los derivados de las anfetaminas, como la metanfetamina, la 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA), la 3,4-metilendioxietanfetamina (MDEA, "eve") y la p-metoxianfetamina (PMA) [90,91]. La hipertermia ocasiona complicaciones que conducen a la muerte, como son la descomposición de los músculos (rabdomiolisis), insuficiencia renal aguda, coagulación intravascular, insuficiencia multiorgánica y acidosis [92,93].

Otro mecanismo de la toxicidad de las anfetaminas es la formación de especies reactivas de oxígeno y/o especies reactivas de nitrógeno y el estrés oxidativo y/o nitrosativo [94,95], como en el SNC [96].

En el cerebro, las anfetaminas activan la liberación de las monoaminas al unirse a las proteínas transportadoras de la membrana plasmática en las neuronas, el transporte y translocación de las anfetaminas al citoplasma, estimula la liberación de los neurotransmisores [97,98]. Las anfetaminas tienen diferente afinidad hacia los transportadores de NA, DA y a la SERT, siendo más afines al transportador de NA y menos afín a la SERT [99,100].

Las anfetaminas inducen la liberación de neurotransmisores NA, DA y 5-HT por dos mecanismos: (1) los neurotransmisores salen de la célula como resultado de sus gradientes de concentración

a través de la inversión de la función de las proteínas transportadoras y (2) las concentraciones citoplasmáticas de los neurotransmisores aumentan debido a la liberación inducida por las anfetaminas al impedir su almacenamiento en vesículas [9,101,102]. En un primer paso, las anfetaminas son reconocidas por las proteínas transportadoras y entran en la neurona monoaminérgica. En la célula, las anfetaminas difunden a la hendidura sináptica a través de la membrana y quedan disponibles para ser nuevamente recapturados por los transportadores [100]. Las anfetaminas son sustratos para el transportador vesicular de monoaminas (VMAT) y posiblemente ingresen a las vesículas a través de VMAT y agoten el almacén de neurotransmisores vesiculares al invertir la actividad del transportador, produciendo la liberación de las monoaminas de las vesículas sinápticas [102]. Las anfetaminas también pueden agotar el contenido de aminas biogénicas vesiculares al interrumpir el gradiente de pH, a través de un efecto de base débil que activa el transportador [103]. Las anfetaminas también tienen propiedades inhibitorias de la MAO, por lo que aumentan el contenido citosólico de las monoaminas al inhibir su metabolismo [104].

Las anfetaminas también tienen la capacidad de regular la actividad de los transportadores de monoaminas. Regulan el estado de fosforilación del transportador, y como consecuencia su función [98]. La pérdida de la función del transportador se acompaña de la disminución de la expresión de estos.

El aumento en la reserva citoplasmática de monoaminas desencadena estrés oxidativo en la terminal nerviosa por dos mecanismos. La autooxidación de las catecolaminas, DA y NA induce la producción de especies reactivas de oxígeno. En segundo lugar, el metabolismo de las monoaminas por la MAO también genera la formación de especies reactivas de oxígeno como subproductos. Vía la activación de estos mecanismos en la terminal monoaminérgica se favorece su degeneración [85], que puede ser parcial, con pérdida de terminales, axones o dendritas, o total con la muerte de las neuronas [105].

Los marcadores bioquímicos de neurotoxicidad incluyen la disminución de las concentraciones de monoaminas y sus principales metabolitos, de los sitios de unión a sus proteínas transportadoras, así como a la menor expresión y/o actividad de las enzimas involucradas en su síntesis y metabolismo [105].

Otras anfetaminas también disminuyen las concentraciones de monoaminas en el cerebro. Las cloroanfetaminas, particularmente la p-cloroanfetamina (pCA), disminuye 5-HT en el cerebro de ratas y de cobayos [106]. En ratas adultas, la administración de metanfetamina y fenfluramina disminuye las monoaminas cerebrales. En el cerebro de rata, la metanfetamina disminuye NA y 5-HT, mientras que la fenfluramina disminuye 5-HT de forma selectiva y prolongada [107].

III.3.1 p-Cloroanfetamina

La pCA es un análogo clorado de la anfetamina similar al MDMA, en el cerebro disminuye la concentración de 5-HT, sin modificar NA. Por ello, se considera a la pCA una herramienta en la investigación sobre la función serotoninérgica en el SNC. De forma aguda, la pCA libera la 5-HT y mejora la función serotoninérgica, pero agota las reservas de 5-HT. El efecto a largo plazo es el agotamiento de la 5-HT, la disminución de la función serotoninérgica y la degeneración de las terminales serotoninérgicas [108]. Cuando a ratas macho adultas se les administra una (0.1 mmol/Kg i.p.) o dos dosis de pCA, la concentración de 5-HT y el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el cerebro disminuye [109] así como la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa [110].

En el cerebro de la rata adulta, la administración de pCA por 5 días, disminuye la concentración de 5-HT, su metabolito, la recaptura de 5-HT, la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa y la expresión de la SERT efecto que se mantiene hasta por 4 semanas después de la administración de la pCA [110–112]. También se observa degeneración de las fibras serotoninérgicas [113,114]. La susceptibilidad de las neuronas serotoninérgicas a la acción de la pCA es diferente. Las fibras serotoninérgicas que se originan en el NDR degeneran, mientras las que se originan en el NMR son más resistentes a los efectos neurotóxicos de la pCA [114].

El efecto de la pCA es el resultado de la transformación de la 5-HT a 5,6-dihidroxitriptamina, metabolito que ejerce el efecto neurotóxico [113]. Otros metabolitos que se han asociado al efecto neurotóxico de la pCA son el β -hidroxi-pCA y la 3-cloro-4-hidroxianfetamina [112,115]. También se propone que el efecto neurotóxico de la pCA se asocia a la formación de radicales libres [108].

III.4 Inhibidores Selectivos de la Recaptura de Serotonina

Los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (ISRS), inhiben selectivamente la recaptura de 5-HT en las terminales de las neuronas serotoninérgicas. Esto permite que la concentración de 5-HT aumente en la sinapsis, favoreciendo la transmisión serotoninérgica. Los ISRS se utilizan en el tratamiento de trastornos psicológicos, en particular en la depresión y ansiedad [116,117]. La inhibición de la recaptura de 5-HT en el SNC aumenta la concentración de 5-HT en la hendidura sináptica, permitiendo que la amina se una a sus receptores en la neurona postsináptica y aumenta el tiempo de permanencia de la 5-HT en la hendidura, y la transmisión serotoninérgica [116].

Originalmente los ISRS se prescribieron para el tratamiento de la depresión, bajo la premisa de que tal trastorno de la conducta era consecuencia, en parte, de la disminución de la transmisión serotoninérgica, por lo que aumentar la disponibilidad de 5-HT mejoraría a los pacientes con este padecimiento [117].

Entre los niños y adolescentes, la ansiedad es muy frecuente, con una prevalencia a lo largo de la vida del 15–20 %. Este padecimiento también se asocia con la disminución en la transmisión serotoninérgica [118]. Se reporta que los ISRS pueden afectar la fisiología reproductiva del humano [116,119–126] (Tabla 2).

III.4.1 Fluoxetina

La Flx (Prozac) es un ISRS que impide la recaptura de la 5-HT, lo que resulta en el aumento en la concentración de 5-HT en la hendidura sináptica, y el aumento de la transmisión serotoninérgica [127]. Para que la 5-HT sea transportada por la SERT, es necesario que la 5-HT⁺, Na⁺, y Cl⁻ se unan para que cambie la estructura de la SERT que conducen a la traslocación de la 5-HT. La Flx, en presencia de Cl⁻, compite con la 5-HT para unirse a la SERT, la unión de la Flx impide que la SERT cambie su conformación y trasloque a la 5-HT, impidiendo su recaptura [128]

El bloqueo de la SERT desensibiliza la terminal de la neurona serotoninérgica, y ocasiona la internalización de la SERT. Esto conduce a la disminución de la concentración de 5-HT en el citoplasma de la neurona, induce la síntesis y la liberación, favoreciendo la acumulación de 5-HT en la hendidura sináptica [127].

Tabla 2. Características de los ISRS y sus efectos en la reproducción.

ISRS	Dosis terapéutica diaria	Efectos en la fertilidad	Efectos en la fertilidad
Citalopram	Adulto: 20 mg	Efectos adversos sobre el desarrollo fetal y posnatal. Peso reducido al nacimiento, muerte y toxicidad materna. Disminución del número y movilidad de los espermatozoides. Aumento de espermatozoides con anormalidades.	Safirenejad 2008 [125] Elnazer y Baldwin 2014 [120] Fain y Gad 2014 [116]
Escitalopram	Adulto: 10 mg	Efectos teratógenos. Peso reducido al nacimiento, muerte y toxicidad materna. Provoca contracción de las trompas de Falopio. Disminución del número y movilidad de los espermatozoides. Aumento de espermatozoides con anormalidades.	Safirenejad 2008 [125] Koyuncu et al. 2011 [122] Fain y Gad 2014 [116]
Paroxetina	Adulto: 20 mg Niño: 10 mg	Provoca contracción de las trompas de Falopio. Fragmentación del ADN de los espermatozoides.	Safirenejad 2008 [125] Tanrikut y Schlegel 2007 [126]
Sertralina	Adulto: 50 mg Niño(6-12 años): 25 mg	Disminución del número y movilidad de los espermatozoides. Aumento del número de espermatozoides con anormalidades.	Safirenejad 2008 [125] Akasheh et al. 2014 [119]
Fluoxetina	Adulto: 20 mg Niño(6-18 años): 10 mg	Disminución del número y movilidad de los espermatozoides. Reducción del peso de los órganos del aparato reproductor. Disminución en la concentración en suero de testosterona y FSH. Ciclos estrales irregulares, con estros prolongados .	Safirenejad 2008 [125] Friedman et al. 2009 [121] Moore et al. 2015 [124]

El Prozac es una combinación de dos compuestos, el enantiómero R y S de la Flx. El metabolito principal de la Flx, la norfluoxetina, también está conformado por los enantiómeros R y S. Tanto la Flx como la norfluoxetina son potentes inhibidores de la recaptura de 5-HT [129].

La Flx que se administra por vía oral se absorbe casi por completo, pero su disponibilidad sistémica disminuye debido a que es metabolizada en el hígado. La mayor parte de la Flx se elimina vía el metabolismo oxidativo [130]. Las vida media de eliminación de Flx y norfluoxetina es de 1 a 3 y 4 a 16 días, respectivamente [131].

Otro de los efectos de la Flx es la inhibición de la expresión de la enzima triptófano hidroxilasa en el núcleo dorsal del rafe [132] y de la monoamino oxidasa-A [133]. También actúa como un agonista de los receptores a serotonina 5-HT₂ [134].

IV. METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas hembras de 30 días de edad de la cepa CIIZ-V mantenidas en condiciones controladas de iluminación (14h luz/10h oscuridad), con temperatura controlada de 21°C, humedad de 37-40% y con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días de edad) y posteriormente al agua y alimento. Todos los experimentos se realizaron de conformidad con lo establecido en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-199, Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio y la aprobación del Comité de Bioética de la Facultad de Estudios Superiores-Zaragoza, UNAM (FESZ/DEPI/CE/001/21).

1. Inhibición del sistema serotoninérgico

Los animales se asignaron aleatoriamente en los siguientes grupos experimentales: 1) control absoluto (CA) ratas intactas; 2) grupo vehículo (Vh), las ratas recibieron una inyección de solución salina (0,9% NaCl); 3) grupo pCA, las ratas se inyectaron con 10 mg/Kg de p.c. de p-cloroanfetamina (pCA) (Sigma-Aldrich, MO, USA). Las ratas fueron inyectadas una sola ocasión en el día 30 de edad. Trece ratas de cada grupo experimental fueron sacrificadas después de 48 o 120h del tratamiento.

2. Estimulación del sistema serotoninérgico

Las ratas hembras se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales: 1) grupo Flx5 que recibieron una inyección de 5 mg/kg de peso corporal de Flx (Sigma- Aldrich, MO, USA) disuelta en solución salina; y 2) grupo Flx10 que recibieron una inyección de 10 mg/kg de peso corporal de Flx disuelta en solución salina. Las ratas fueron inyectadas una sola ocasión en el día 30 de edad. Trece ratas de cada grupo experimental fueron sacrificadas después de 48 o 120h del tratamiento.

En la primera parte del trabajo se evaluó el efecto de la pCA o de la Flx en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo y en el ovario; en la concentración de testosterona y estradiol en el suero; la presencia de las proteínas apoptóticas BAX, caspasa-3 activa y el receptor a serotonina 5-HT₇ (R5-HT7) en el ovario. Diez ratas de cada grupo experimental fueron autopsiadas por decapitación 48 o 120h después del tratamiento.

En la segunda parte del trabajo se analizó el efecto de la pCA o de la Flx en el ovario, el desarrollo folicular y la atresia. Para ello, se evaluaron los siguientes parámetros: población folicular, inmunodetección del R5-HT7, inmunodetección de la caspasa 3 y marcaje terminal de desoxinuceotidil transferasa (TUNEL) en células de la granulosa. Tres ratas de cada grupo experimental fueron autopsiadas por perfusión 48 o 120h después del tratamiento.

IV.1 Autopsia

Las ratas de los diferentes grupos experimentales (n = 10) fueron autopsiadas por decapitación entre las 10:00 y las 11:00 h, y se colectó la sangre del tronco. Se hizo la disección de los ovarios y el cerebro y se colocaron en solución salina fría. El cerebro se congeló en nitrógeno líquido y luego se colocó sobre una placa de metal fría con el lado dorsal hacia arriba. El hipotálamo anterior y medial se disecaron siguiendo los puntos de referencia descritos en el atlas estereotáxico para ratas [135] y una modificación del procedimiento informado previamente por Heffner [136]. Usando un juego de tres hojas de afeitar montadas en un hipotalamometro, se obtuvieron un par de cortes coronales del cerebro. El primer corte disecado fue el hipotálamo anterior (Bregma 1.3 a bregma 2.3), que incluía las áreas preóptica anterior y media, el núcleo supraquiasmático, el núcleo paraventricular, el núcleo periventricular y el área preóptica de la estría terminal. En el segundo corte se diseccionó el hipotálamo medial (Bregma 2.3 a bregma 3.3), que incluía la eminencia mediana y el núcleo arqueado. Ambas regiones hipotalámicas y el ovario izquierdo se almacenaron a -70 °C hasta su análisis.

El ovario izquierdo y el hipotálamo anterior y medio (n= 10 de cada grupo) se almacenaron individualmente a -70 °C hasta su procesamiento y cuantificación de 5-HT y 5-HIAA mediante cromatografía de alta presión (HPLC). En el ovario derecho (n = 5 de cada grupo), las proteínas caspasa 3, Bax y el R5-HT7 se analizaron mediante Western blot. La sangre colectada del tronco, se mantuvo a temperatura ambiente durante 20 min y se centrifugó a 1744 x g durante 15 min. El suero se almacenó a -20 °C hasta que se midieron las concentraciones de testosterona y estradiol.

IV.2 Perfusión

Otras ratas de los diferentes grupos experimentales (n = 3 ratas/por grupo) fueron anestesiadas con pentobarbital sódico y perfundidas a través del ventrículo izquierdo con solución salina

fisiológica seguida de 150 mL de paraformaldehído al 4% en tampón de fosfato de sodio, pH 7.4, manteniendo un flujo de perfusión de 8 ml/min.

Concluida la perfusión, se extrajeron y diseccionaron los ovarios. Ambos ovarios fueron posfijados por inmersión en paraformaldehído al 4 % durante 24 h a 4°C, seguido de inmersión en sacarosa al 15 % en solución salina tamponada con fosfato (PBS) durante 48h a 4°C, seguido de inmersión en etanol al 70 % a temperatura ambiente. Posteriormente, los ovarios se deshidrataron en concentraciones crecientes de etanol y luego se incluyeron en Paraplast® (Leica Biosystems, IL, USA). Los ovarios izquierdos, se cortaron en secciones seriadas (de 7 µm de espesor) utilizando un micrótopo deslizante (AO American optical, mod 820, USA) y se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Las secciones se procesaron inmunohistoquímicamente para la detección de proteínas caspasa 3, Bax y del R5-HT7 y células apoptóticas mediante la tinción TUNEL (Marcado de final de corte de dUTP de Terminal deoxinucleotidil transferasa).

IV.3 Cuantificación de 5-HT y 5-HIAA

La concentración de 5-HT y 5-HIAA se midió por HPLC como fue descrito previamente por Ayala [137]. Las muestras de hipotálamo y ovario (n = 10 ratas/por grupo) se pesaron en una balanza de precisión, se homogeneizaron en 300 mL de ácido perclórico 0,1 M y se centrifugaron a 13467 x g durante 30 min a 4 °C. El sobrenadante se filtró utilizando filtros de celulosa regenerada de 0,2 mm y se inyectaron 20 ml de cada extracto en una columna de cromatografía a través de una válvula Rheodyne. Las calibraciones se realizaron mediante el desarrollo de una curva estándar en el rango de 0,1 a 1 ng/mL para 5-HT y 5-HIAA, que se identificaron por el tiempo de retención relativo en comparación con sus respectivos estándares. Los resultados se expresan como la cantidad de neurotransmisor por peso de tejido (ng/mg).

IV.4 Cuantificación de Hormonas Esteroides

Las concentraciones séricas (n = 10 ratas/por grupo) de testosterona y 17β-estradiol se midieron mediante inmunoensayos utilizando kits Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA). Las concentraciones de testosterona y 17β-estradiol se expresan en pg/ml. Los coeficientes de variación intraensayo e interensayo fueron 3,9% y 7,6%, respectivamente, para testosterona y 4,9% y 8,01%, respectivamente, para 17β-estradiol.

IV.5 Desarrollo folicular

Se evaluaron tres ovarios derechos de ratas de los diferentes grupos experimentales. Mediante un ocular micrométrico adaptado a un microscopio óptico Optiphot-2 (Nikon Instruments, Melville, Nueva York) se midió el diámetro mayor y el diámetro perpendicular a este, y a partir de los diámetros se calculó el diámetro promedio. Con base en el diámetro, los folículos se clasificaron en tres categorías: pequeños ($< 200 \mu\text{m}$), medianos ($200\text{--}400 \mu\text{m}$) y grandes o preovulatorios ($> 400 \mu\text{m}$). Los folículos también se clasificaron como sanos o atrésicos. Se utilizaron como criterios de atresia los cambios degenerativos detectables por microscopía óptica: la presencia de más de ocho núcleos picnóticos en células de la granulosa por folículo, descamación de las células de la granulosa en el antro folicular, hipertrofia de la teca interna y signos de degeneración en el ovocito [74,75].

IV.6 Análisis TUNEL

El ovario izquierdo ($n = 3$ por grupo) se deshidrató e incluyó en Paraplast® (Leica Biosystems, IL, EE. UU.). Se tomaron secciones seriadas de un espesor de $7 \mu\text{m}$ cada $100 \mu\text{m}$. El marcaje de extremos de ADN se realizó con la ayuda de un kit de apoptosis de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA), para lo cual se montaron las secciones en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se desparafinaron, se hidrataron y se trataron con 20 mg/mL de proteinasa K (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) durante 30 min a $37 \text{ }^\circ\text{C}$ en una cámara húmeda. La peroxidasa endógena se bloqueó durante 20 min con solución de bloqueo (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). El tejido se trató con solución de permeabilización ($0,1 \%$ Triton en citrato de sodio al $0,1 \%$) durante 2 min . Las secciones de tejido se trataron con solución marcadora (enzima desoxinucleotidil transferasa terminal (TdT) y 16-dUTP biotinilado) durante 60 min . Después de cada paso, se enjuagó el tejido dos veces durante 5 minutos cada vez. Luego se incubó con convertidor-POD (anti-fluoresceína conjugada con peroxidasa de rábano picante) 30 min a $37,8 \text{ }^\circ\text{C}$ y se contrastó con hematoxilina de Mayer, se deshidrató y se montó para microscopía óptica. En los portaobjetos de control negativo, se omitió la enzima TdT o el 16-dUTP biotinilado al marcar la reacción.

Las secciones teñidas con TUNEL se observaron utilizando un microscopio Optiphot-2 (Nikon Instruments, Melville, Nueva York) con un aumento total de $400\times$. Las micrografías se tomaron con un teléfono (Redmi Note 8). Se analizaron todas las secciones de los folículos para detectar

la presencia de células foliculares positivas para TUNEL. Los resultados se presentan como intensidad de la marca en función del número de células de la granulosa positivas para TUNEL por folículo. Los folículos se clasificaron en dos categorías: i) marca moderada, de 1 a 10 células de la granulosa positivas para TUNEL, y ii) marca intensa, más de 10 células de la granulosa positivas para TUNEL.

IV.7 Inmunohistoquímica para R5-HT7

Se usaron nueve secciones de ovario por animal ($n = 3$ por grupo) para detectar el R5-HT7. Las secciones de ovario se montaron en portaobjetos recubiertos con poli-L-lisina, se desparafinaron en xilol y se rehidrataron con diferentes graduaciones de etanol; las peroxidasa endógenas se bloquearon con H_2O_2 al 3 % y la unión de anticuerpos no específicos se bloqueó con albúmina sérica bovina al 10 %. Los cortes se incubaron con 40 μ l de anticuerpo policlonal de conejo R5-HT7 (Dilución: 1:100, Abcam 128892, Cambridge, Reino Unido), se cubrieron con parafilm y se incubaron durante toda la noche en una cámara húmeda a 4 °C. Después de cada paso, se lavaron las secciones con PBS durante 5 min cada vez. Luego, se incubaron las secciones con el anticuerpo secundario biotinilado anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa de rábano picante (kit Vectastain ABC Elite; Vector, Inc. Burlingame, CA, USA) durante 45 min. La inmunorreactividad se detectó con un complejo de avidina-biotina de peroxidasa de rábano picante (DAB) (Vector, Inc. Burlingame, CA, USA), las preparaciones fueron contrateñidas con hematoxilina y montadas con Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). Como control negativo, se realizó una sección siguiendo los mismos pasos descritos anteriormente, pero se omitió el anticuerpo para el R5-HT7. La expresión del R5-HT7 se identificó en los diferentes compartimentos del folículo (células de la teca, células de la granulosa y ovocito) utilizando un microscopio óptico (Nikon, CA, USA).

IV.8 Western blot

Las proteínas se extrajeron del tejido de ovario ($n = 5$ por grupo) utilizando tampón de lisis RIPA (Sigma–Aldrich, MO, USA) y una mezcla de inhibidores de proteasa (P8340; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.), en proporción de 200 μ l de tampón de lisis por cada 10 mg de tejido. Las concentraciones de proteína se determinaron utilizando un kit de ensayo Pierce™ BCA (23227, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts USA). Se cargó un total de 20 μ g de proteína total por muestra en tampón Laemmli para electroforesis en geles de poliacrilamida al 4-20 % (MP TGX

BIO-RAD, Hercules, CA). Las proteínas se transfirieron electroforéticamente a membranas de nitrocelulosa que fueron bloqueadas posteriormente con una solución de leche al 5% en TBS. Las membranas se incubaron durante toda la noche con una solución que contenía los anticuerpos primarios correspondientes: β -actina (ab-8226, 1:1000) (monoclonal de ratón, Abcam, Cambridge) y BAX (ab-104156, 1:1000), o Cas3 (ab- 216486, 1:1000), o R5-HT7 (ab-128892, 1:1000) (policlonal de conejo, Abcam, Cambridge, Reino Unido), al día siguiente se hizo la detección con IgG anti-conejo conjugada con peroxidasa de rábano picante (ab-270144, 1:1000) y anti-ratón IgG (ab-19195, 1:1000) por dos horas. Las bandas inmunorreactivas se detectaron mediante quimioluminiscencia utilizando el sustrato quimioluminiscente WesternSure PREMIUM (LI-COR Biosciences, USA) con un Cdigit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA). La densidad de las bandas inmunorreactivas se analizó utilizando Image Studio Digits®, V4.0.21, para Windows. Se usó β -actina con fines de normalización.

IV.9 Análisis estadístico

Todos los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism. Las concentraciones de 5-HT, hormonas séricas y la expresión de las proteínas R5-HT7, Caspasa-3 y BAX se analizaron mediante la prueba t de Student. La cantidad de folículos sanos y atrésicos fue evaluada por la prueba de U de Mann-Whitney. El porcentaje de células positivas para TUNEL se comparó con los controles mediante la prueba de chi-cuadrado. Todos los valores se expresan como la media \pm S.E.M. Se consideró significativa una probabilidad inferior al 5%.

V. RESULTADOS

En comparación con el grupo control absoluto, en el hipotálamo anterior, y medio de los animales con Vh, la concentración de 5-HT fue mayor a las 120h postratamiento. No se observaron diferencias significativas en la concentración sérica de testosterona y estradiol, ni en la expresión de las proteínas Bax, caspasa-3 y el R5-HT7 (Tabla 3).

Tabla 3. Media \pm eem de las concentraciones de 5-HT (ng/mg de tejido) en el hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM) y en el ovario de ratas control absoluto (CA) o tratadas con vehículo (Vh; NaCl 0.9%) y sacrificadas 48 o 120h postratamiento. El número entre paréntesis se indica la n de cada grupo.

	48h		120h	
	CA	Vh	CA	Vh
5-HT-HA	1.10 \pm 0.11 (14)	1.05 \pm 0.15 (10)	1.19 \pm 0.04 (10)	1.61 \pm 0.09 (10) *
5-HT-HM	0.88 \pm 0.10 (14)	0.99 \pm 0.07 (10)	1.00 \pm 0.10 (10)	1.30 \pm 0.10 (10) **
5-HT-Ovary	0.37 \pm 0.08 (13)	0.27 \pm 0.03 (9)	0.32 \pm 0.07 (9)	0.39 \pm 0.05 (10)

*p 0.0005 **p 0.0445 vs. CA (t Student)

Debido a que en los animales que se les administro el Vh se modificó la concentración de 5-HT en el hipotálamo y en el ovario, los resultados observados en los animales inyectados con p-cloroanfetamina se compararon con sus respectivos grupos vehículos.

1 Inhibición del sistema serotoninérgico

1.1 pCA y concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio y en el ovario

La concentración de 5-HT y del 5-HIAA en el hipotálamo anterior y medio de los animales que se les inyectó pCA disminuyó a las 48 y 120h postratamiento en comparación con su grupo con Vh (**Figura 6, 7**). En el ovario de estos animales, la concentración de 5-HT fue mayor a las 48h postratamiento y disminuyó a las 120h, mientras que la concentración de 5-HIAA no se modificó (**Figura 8**).

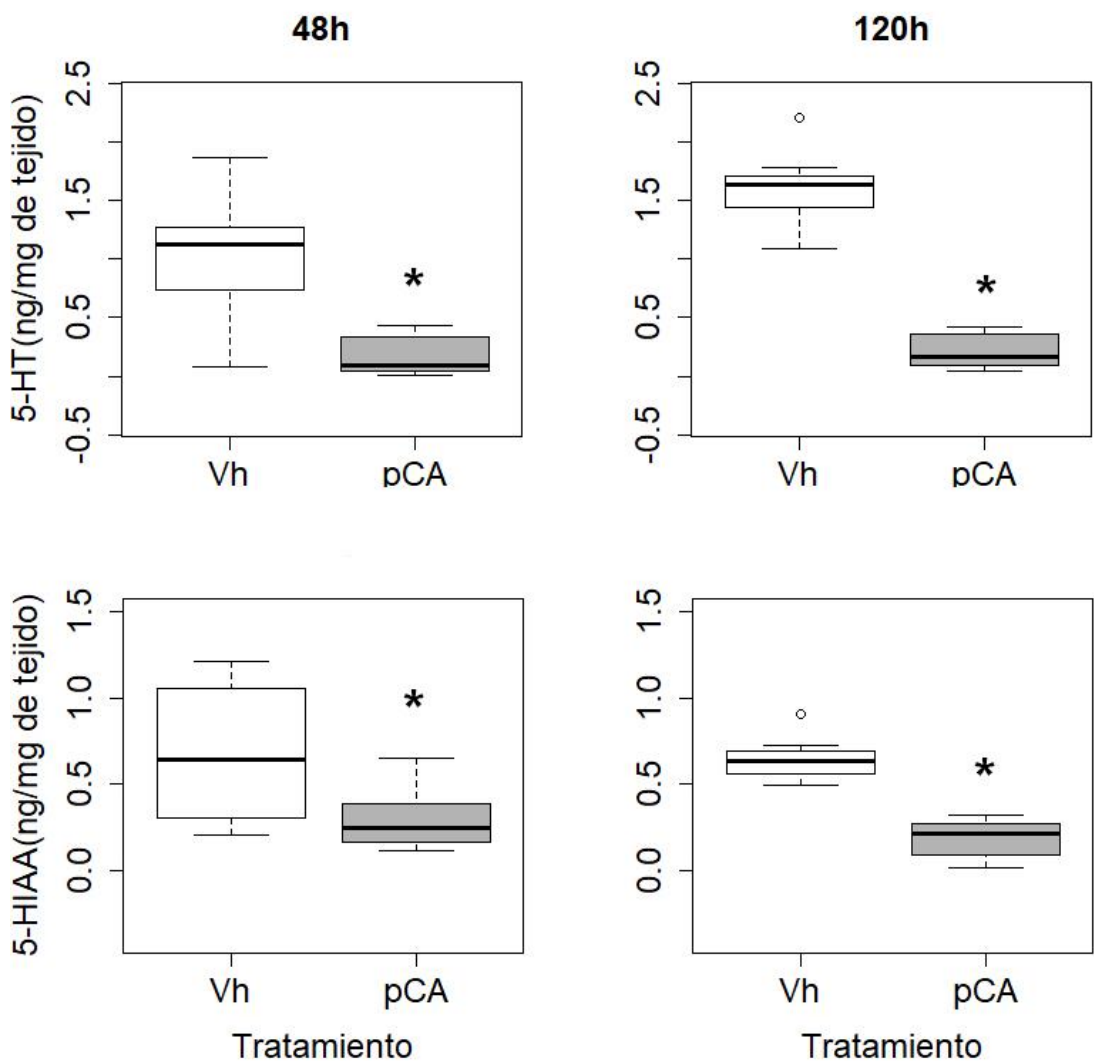


Figura 6. Concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo anterior de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 10 mg/kg de peso corporal de p-cloroanfetamina (pCA) de 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. Los diagramas de caja muestran la mediana (línea negra gruesa) y el primer y tercer cuartil (límites inferior y superior de la caja respectivamente), los valores atípicos son representados con los círculos pequeños. *p < 0.0001 vs. Vh (t Student).

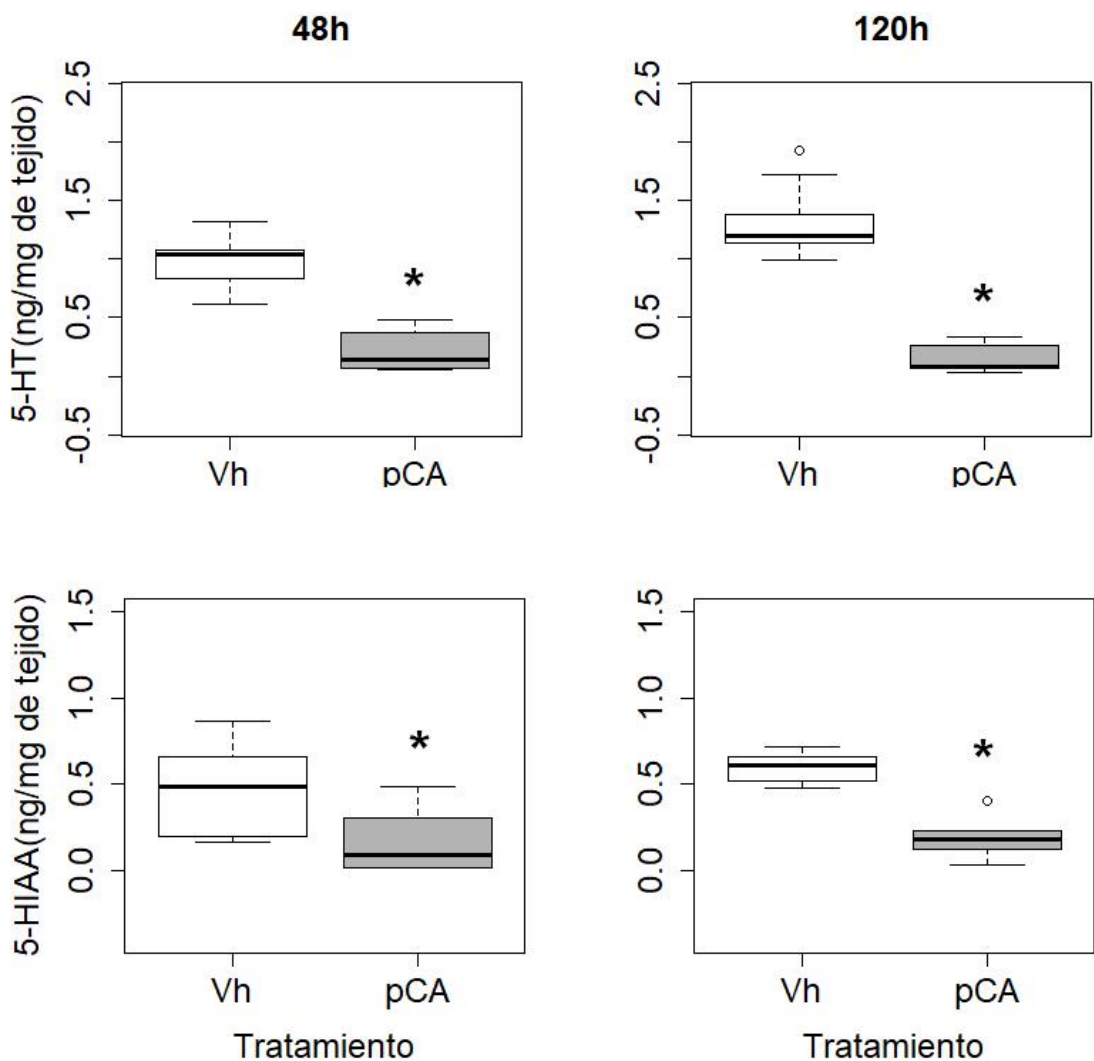


Figura 7. Concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo medio de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 10 mg/kg de peso corporal de p-cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. Los diagramas de caja muestran la mediana (línea negra gruesa) y el primer y tercer cuartil (límites inferior y superior de la caja respectivamente), los valores atípicos son representados con los círculos pequeños. *p < 0.0001 vs. Vh (t Student).

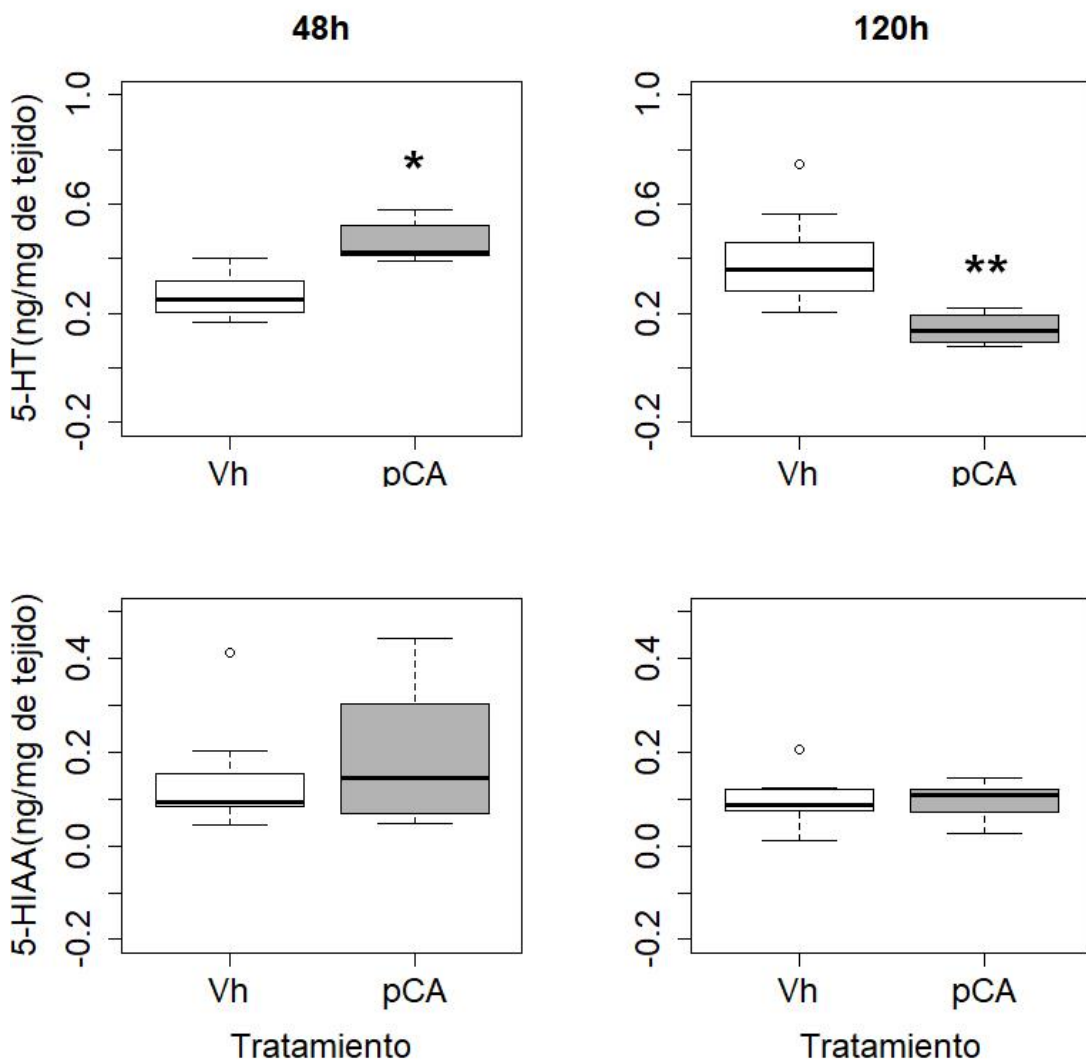


Figura 8. Concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 10 mg/kg de peso corporal de p-cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. Los diagramas de caja muestran la mediana (línea negra gruesa) y el primer y tercer cuartil (límites inferior y superior de la caja respectivamente), los valores atípicos son representados con los círculos pequeños. *p <0.0001, **p 0.0006 vs. Vh (t Student).

1.2 pCA y concentración sérica de testosterona y estradiol

La concentración de testosterona en el suero de los animales tratados con pCA no se modificó. Mientras que, la concentración de estradiol disminuyó a las 48 y 120h postratamiento en comparación con su respectivo grupo con Vh (**Figura 9**).

1.3 pCA y población folicular

En comparación con los animales que recibieron Vh, en los ovarios de las ratas a las que se les inyectó pCA, la proporción de folículos pequeños, medianos y preovulatorios sanos disminuyó a las 48h postratamiento. A las 120h únicamente disminuyó la proporción de folículos preovulatorios sanos (**Figura 10**).

En la figura 11 se muestran fotomicrografías de cortes histológicos de ovarios de ratas tratados con la técnica de TUNEL, en las cuales se observan folículos en diferentes etapas de desarrollo con células positivas a TUNEL (color marron), en apoptosis. Principalmente en las células de la granulosa de los folículos atrésicos medianos y preovulatorios. Estas células se ubicaban predominantemente en las capas que limitan con el antro del folículo. Las células de la teca no presentaron marca positiva a TUNEL en ninguna de las etapas del desarrollo del folículo (**Figura 11 D-I**). Sólo algunos ovocitos de folículos con características de atresia mostraron marca positiva a TUNEL. En las secciones tratadas como control negativo no se observó marca positiva a TUNEL (**Figura 11 A-C**).

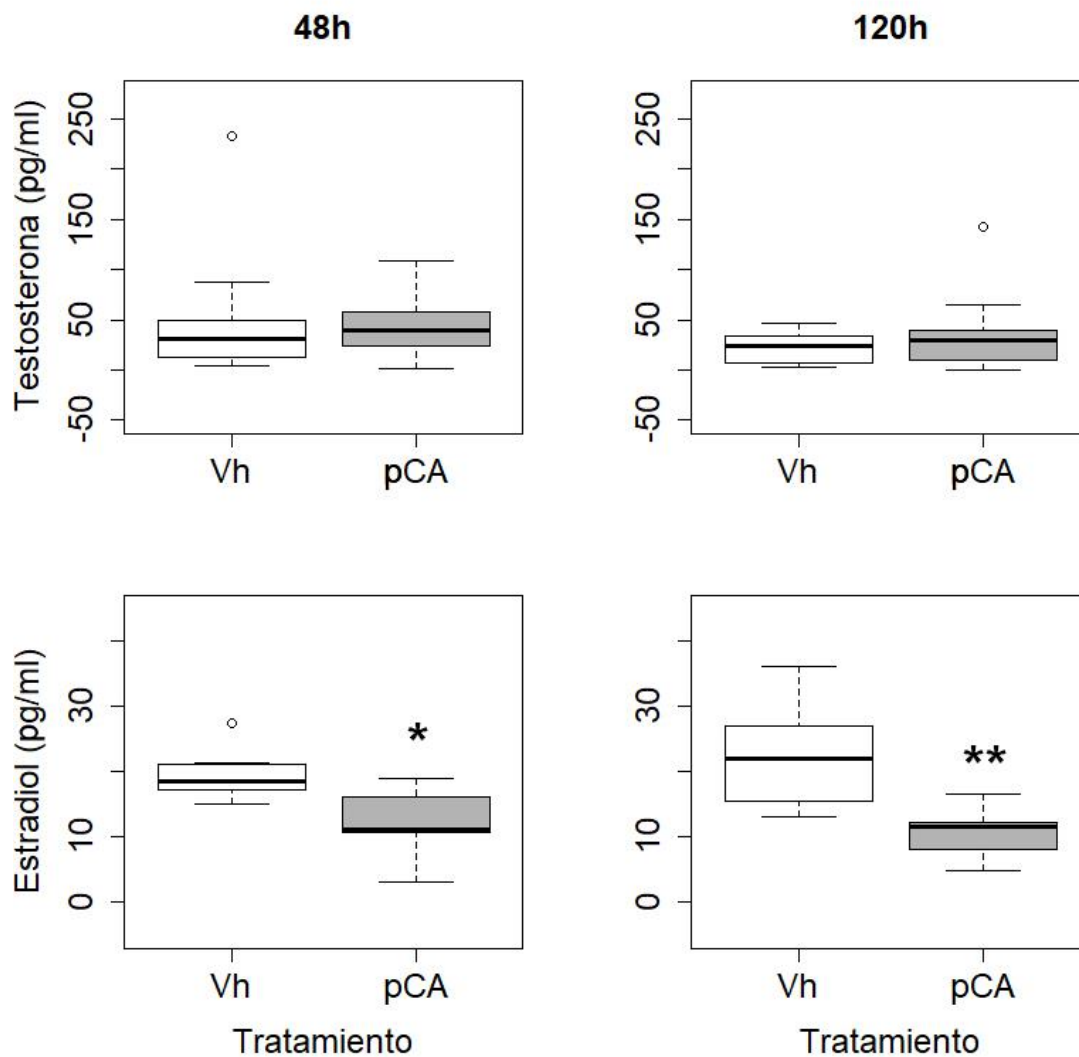


Figura 9. Concentración de testosterona y de estradiol en el suero de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 10 mg/kg de peso corporal de p-cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. Los diagramas de caja muestran la mediana (línea negra gruesa) y el primer y tercer cuartil (límites inferior y superior de la caja respectivamente), los valores atípicos son representados con los círculos pequeños. *p 0.0026, **p 0.0002 vs. Vh (t Student).

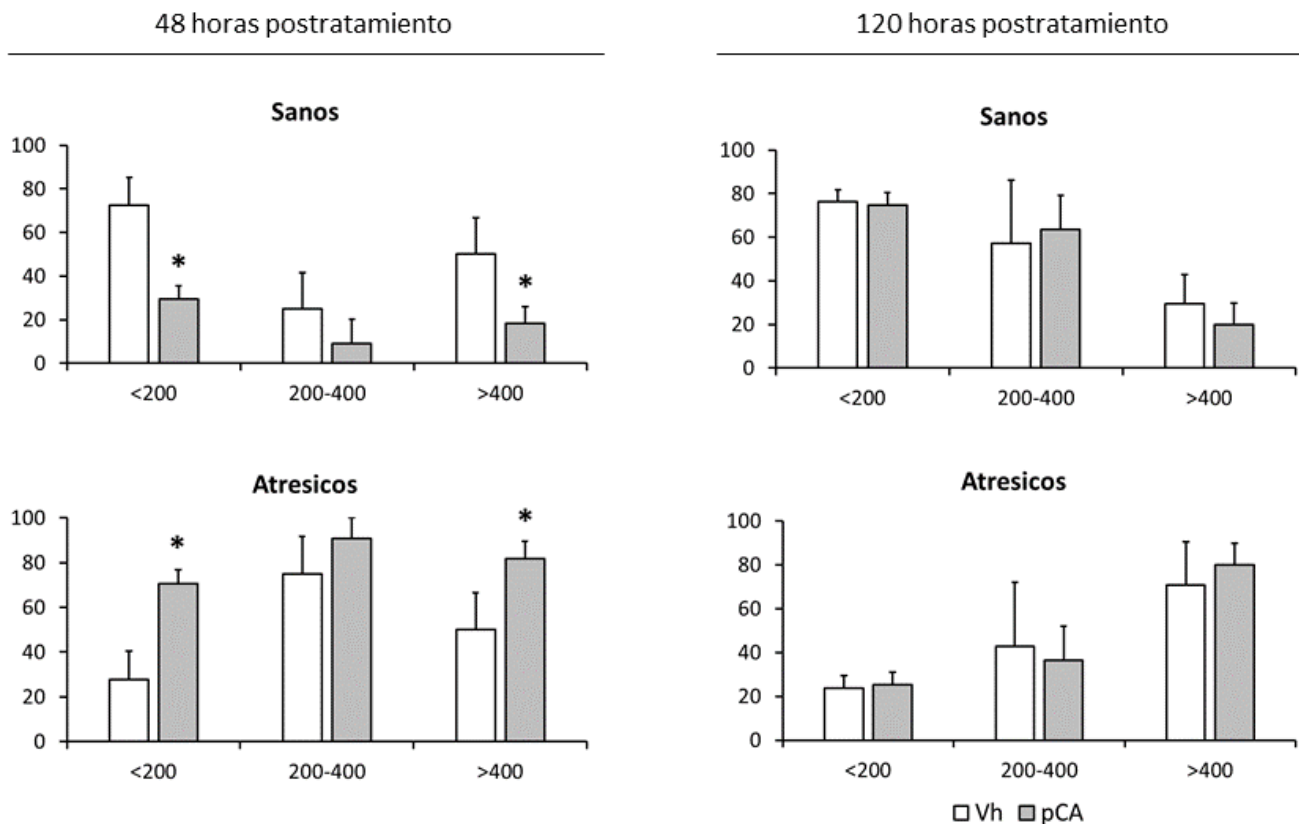


Figura 10. Proporción de folículos sanos y atresicos en el ovario de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 10 mg/kg de peso corporal de p-cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. *p<0.05 vs. Vh (t Student).

Cuando se evaluó la proporción de folículos con células de la granulosa positivas a TUNEL se observó que en los animales tratados con pCA y autopsiados a las 48h o 120h la proporción de folículos pequeños, medianos y preovulatorios con marca moderada disminuyó. La proporción de folículos con marca intensa fue mayor en los pequeños, medianos y preovulatorios en comparación con los animales con Vh (**Figura 12**).

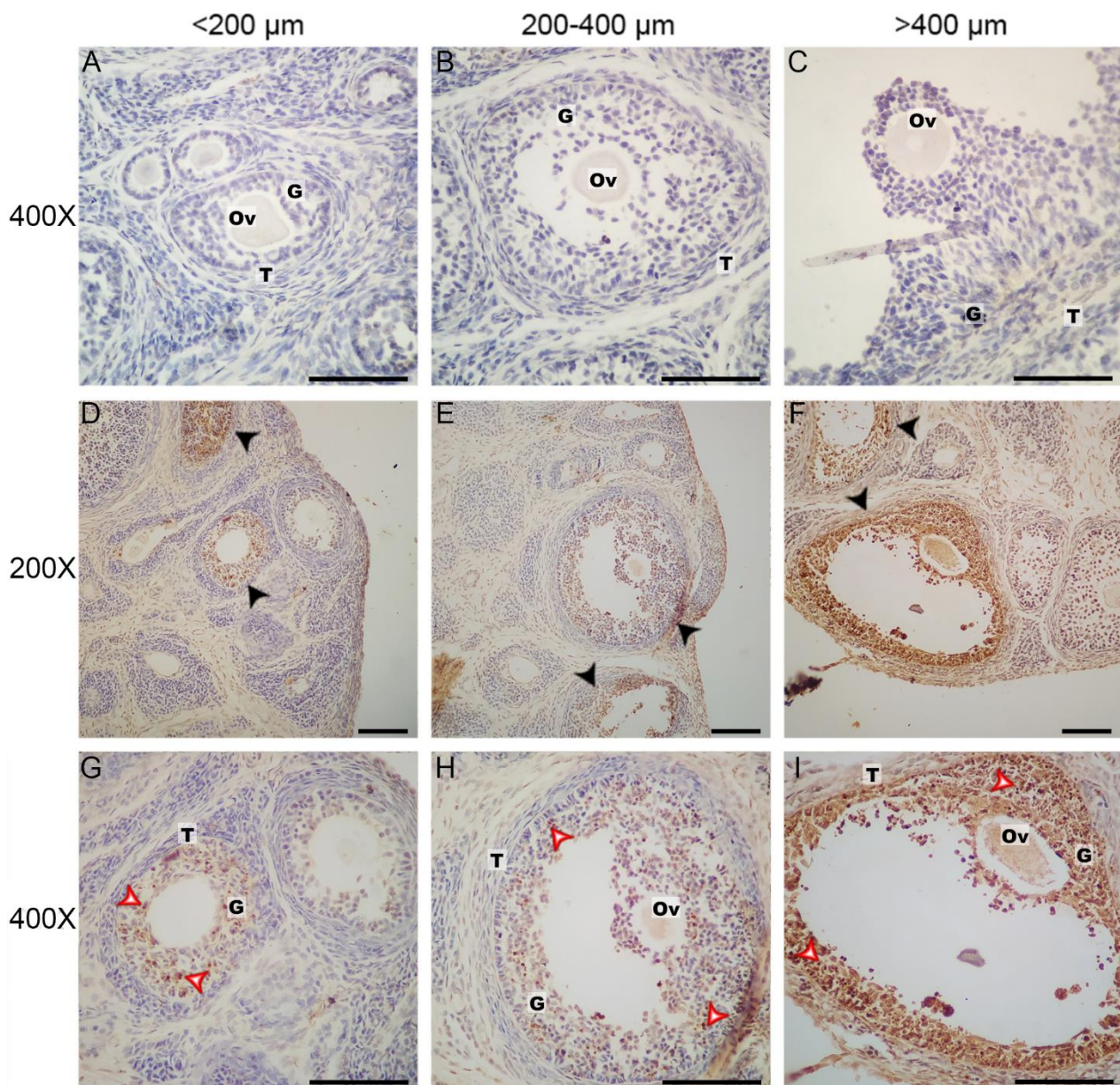


Figura 11. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario tratados por la técnica de TUNEL (D-I). En las secciones se muestran folículos ováricos de diferentes etapas de desarrollo con células de la granulosa positivas a TUNEL (Cabeza de flecha negra). Se señalan algunas células positivas a TUNEL, indicador de apoptosis (Cabeza de flecha roja). (A-C) Secciones representativas de control negativo de folículos en diferentes etapas de desarrollo. Las secciones fueron tomadas con diferentes objetivos (20X y 40X). Ov= ovocito, G= granulosa, T=Teca. Barra de escala=100μm.

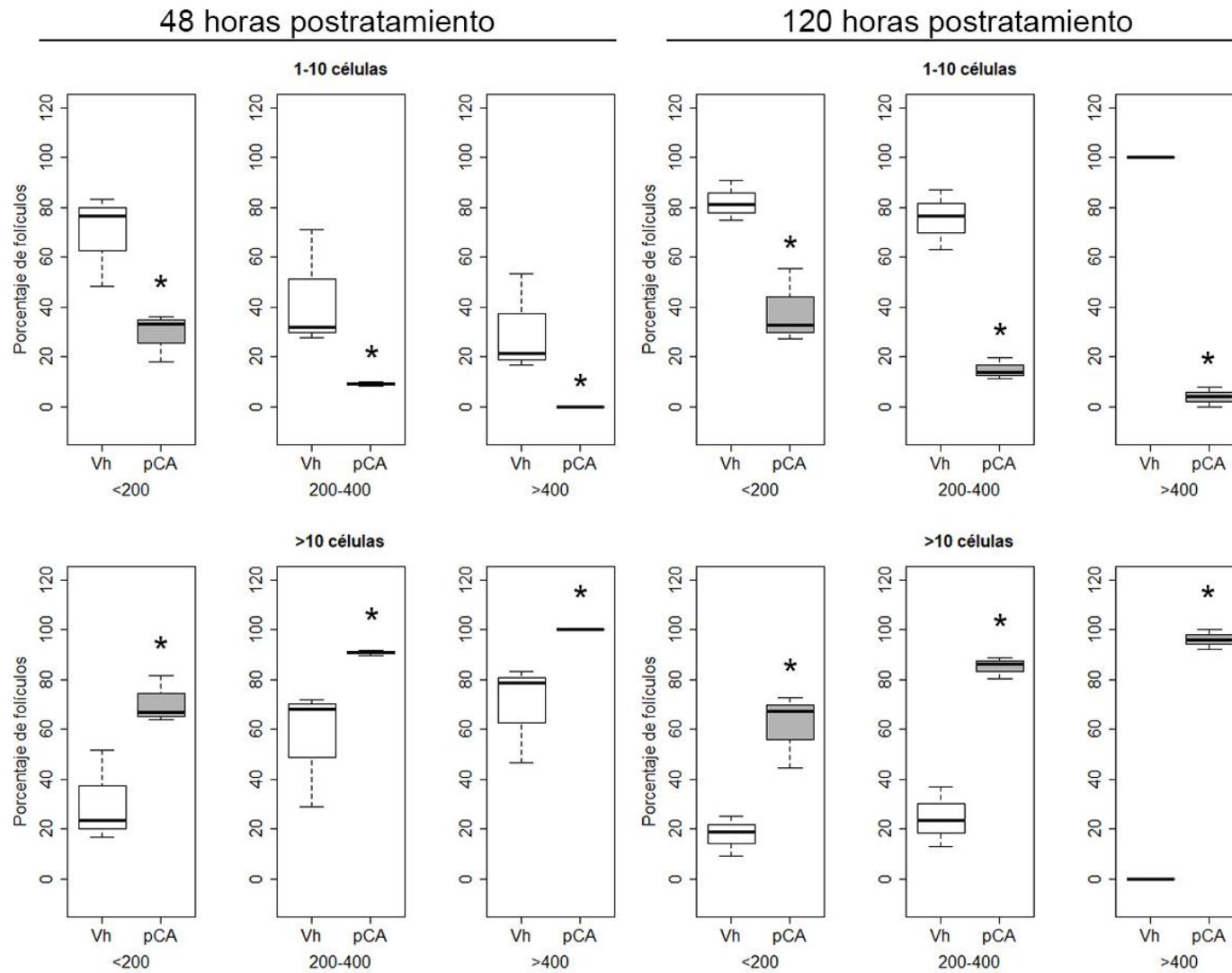


Figura 12. Proporción de folículos con células de la granulosa positivas a TUNEL (Marca moderada: 1-10 células positivas; marca intensa: > 10 células positivas), en folículos (Pequeños: <200 μm ; medianos: 200-400 μm ; preovulatorios: >400 μm) en el ovario de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 10 mg/kg de peso corporal de p-cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. * $p < 0.0001$ vs. Vh (t Student).

1.4 Identificación del receptor 5-HT₇

En el ovario de las ratas inyectadas con Vh o con pCA o Flx (5 ó 10 mg/Kg de peso corporal), se identificó el R5-HT₇, en los folículos en diferentes etapas de desarrollo. La expresión de este receptor se limitó a los ovocitos de los folículos desde primordiales hasta preovulatorios de forma independiente al tratamiento (**Figura 13 D-I**). No se observó tinción en las secciones tratadas como controles negativos (**Figura 13 A-C**).

1.5 pCA y presencia de las proteínas Bax, Caspasa 3 y R5-HT₇

En comparación con los animales a los que se les inyectó Vh, en los ovarios de las ratas inyectadas con pCA no se modificó el contenido relativo de la proteína Bax a las 48h postratamiento y se incrementó a las 120h (**Figura 14 A y B**). Las proteínas, caspasa-3 activa (**Figura 14 C y D**) y la del R5-HT₇ no se modificaron en ninguna de las edades estudiadas (**Figura 14 E y F**).

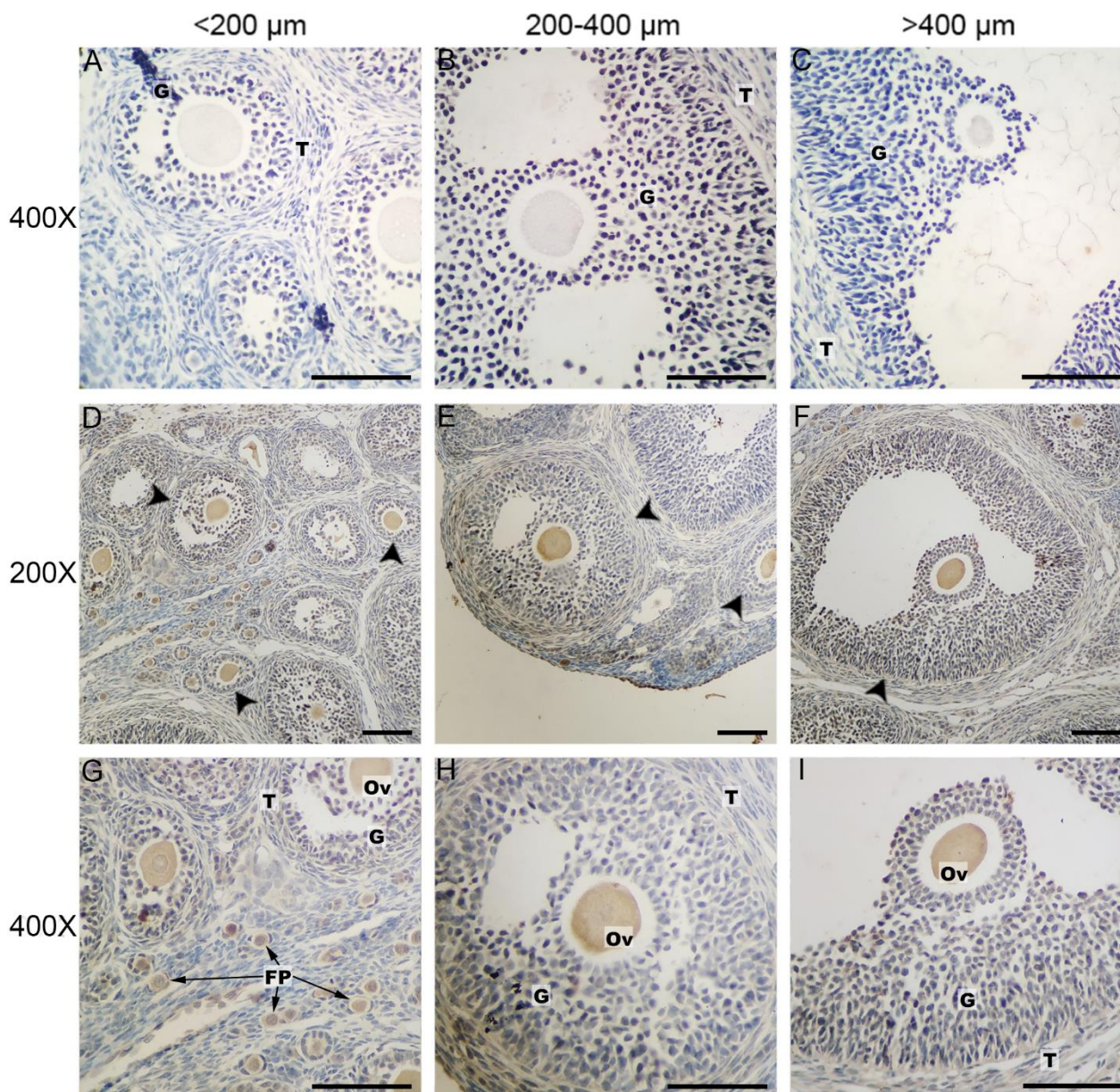


Figura 13. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario teñidos por inmunohistoquímica para el receptor 5-HT₇ (D-I) en ovario de ratas prepúberes. Las fotografías fueron tomadas con diferentes objetivos (20X y 40X). Las cabezas de flecha señalan algunos de los folículos que expresan el receptor 5-HT₇. (A-C) Secciones representativas de control negativo de folículos en diferentes etapas de desarrollo. Ov= Ovocito, G= Granulosa, T=Teca, FP=Folículos primordiales. Barra de escala=100μm.

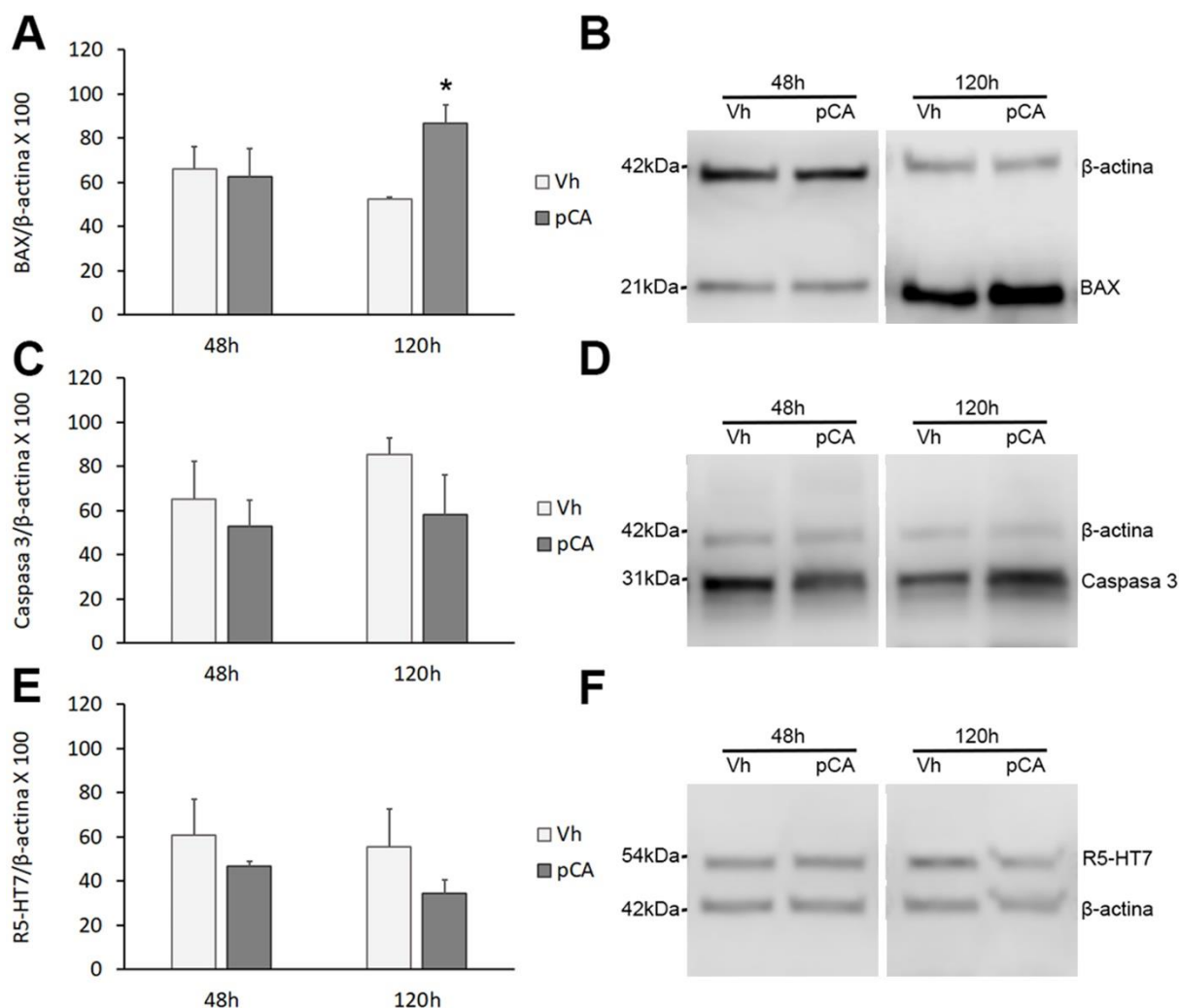


Figura 14. Presencia de las proteínas BAX (A, B), Caspasa 3 activa (C, D), y el R5-HT7 (E, F) en el ovario de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 10 mg/kg de peso corporal de p-cloroanfetamina (pCA) a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento (A, C, E). La expresión de las proteínas fue normalizada con β-actina (B, D, F). *p 0.0029 vs. Vh (t Student).

2. Estimulación del sistema serotoninérgico

2.1 Flx y concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio, y en el ovario

En el hipotálamo anterior de las ratas inyectadas con Flx5 no se modificó la concentración de 5-HT en ninguna de las edades estudiadas, y fue menor en las ratas del grupo Flx10 y autopsiados 120h postratamiento, en relación al grupo control. La concentración del metabolito aumentó en los animales que se inyectaron con Flx5 y autopsiados 48h postratamiento, y disminuyó a las 120h en el grupo con Flx10, en relación con los animales a los que se les inyectó Vh (**Figura 15**).

En comparación con el grupo con Vh, en el hipotálamo medio de las ratas con Flx10, la concentración de 5-HT fue mayor a las 48h postratamiento, y disminuyó en los grupos de animales inyectados con Flx5 o Flx10 y autopsiados a las 120h. La concentración del 5-HIAA aumentó en el grupo de animales con Flx5 y autopsiados a las 48h postratamiento y disminuyó a las 120h de la administración de Flx5 o Flx10 (**Figura 16**).

A las 48h después de la inyección de Flx no se modificaron las concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en el ovario. En los animales sacrificados a las 120h después de la administración del fármaco la concentración de 5-HT fue menor en los animales del grupo Flx5 en comparación con su respectivo grupo Vh (**Figura 17**).

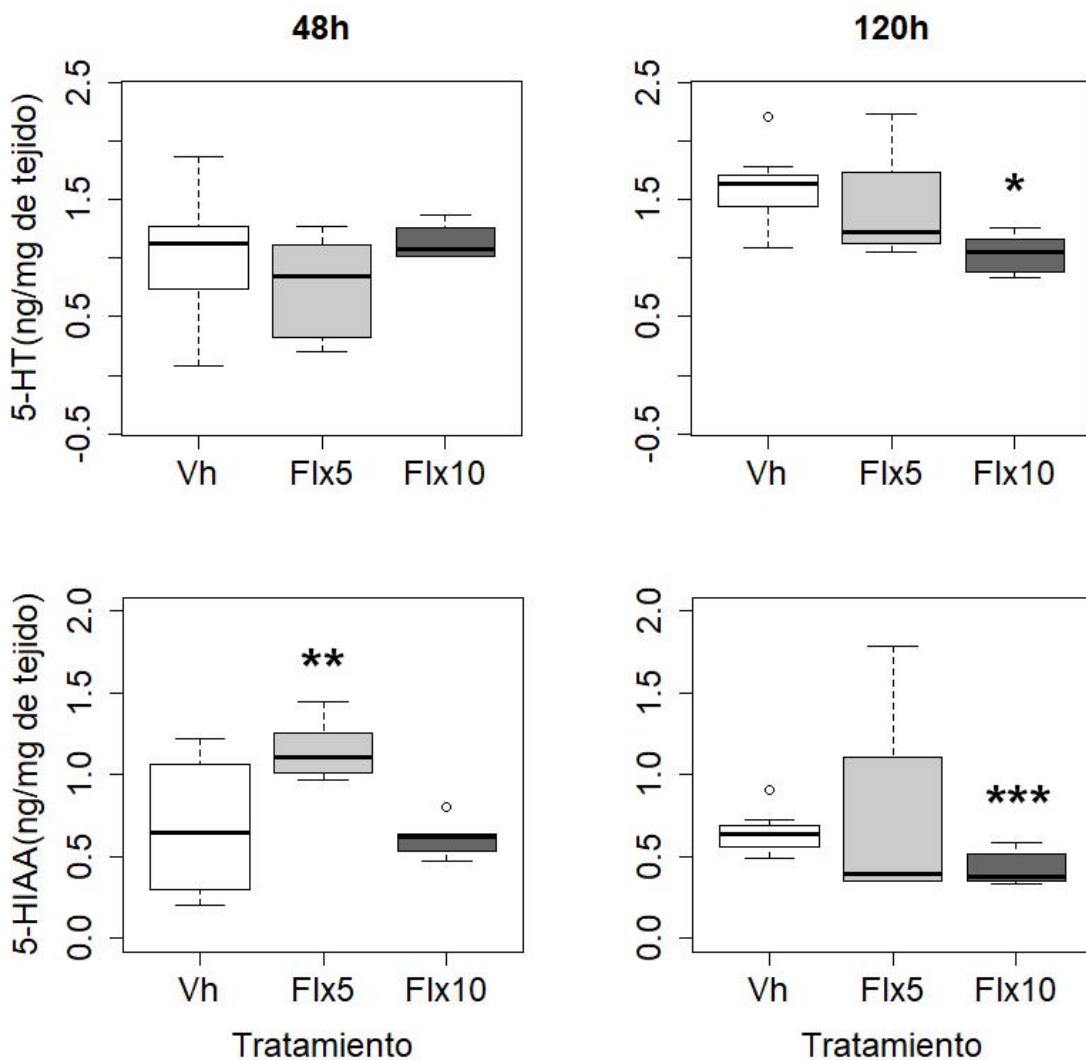


Figura 15. Concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo anterior de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con Flx, 5 mg/kg (Flx5) o 10 mg/kg (Flx10) de peso corporal a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. Los diagramas de caja muestran la mediana (línea negra gruesa) y el primer y tercer cuartil (límites inferior y superior de la caja respectivamente), los valores atípicos son representados con los círculos pequeños. *p < 0.0318 **p < 0.0006 ***p < 0.0023 vs. Vh (t Student).

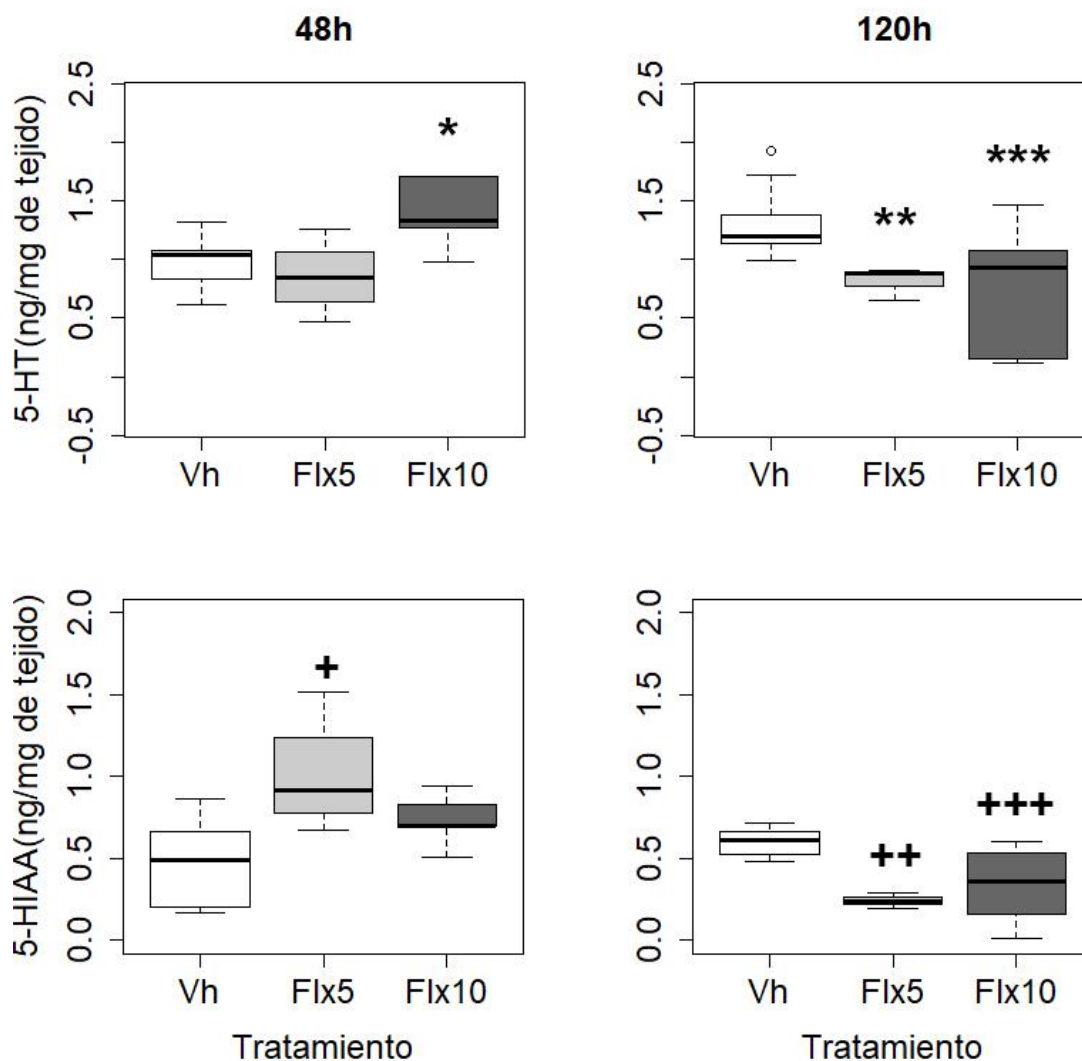


Figura 16. Concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo medio de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con Flx, 5 mg/kg (Flx5) o 10 mg/kg (Flx10) de peso corporal a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h posttratamiento. Los diagramas de caja muestran la mediana (línea negra gruesa) y el primer y tercer cuartil (límites inferior y superior de la caja respectivamente), los valores atípicos son representados con los círculos pequeños. * $p < 0.0059$ ** $p < 0.0227$ *** $p < 0.0244$ + $p < 0.017$ ++ $p < 0.0001$ +++ $p < 0.0054$ vs. Vh (t Student).

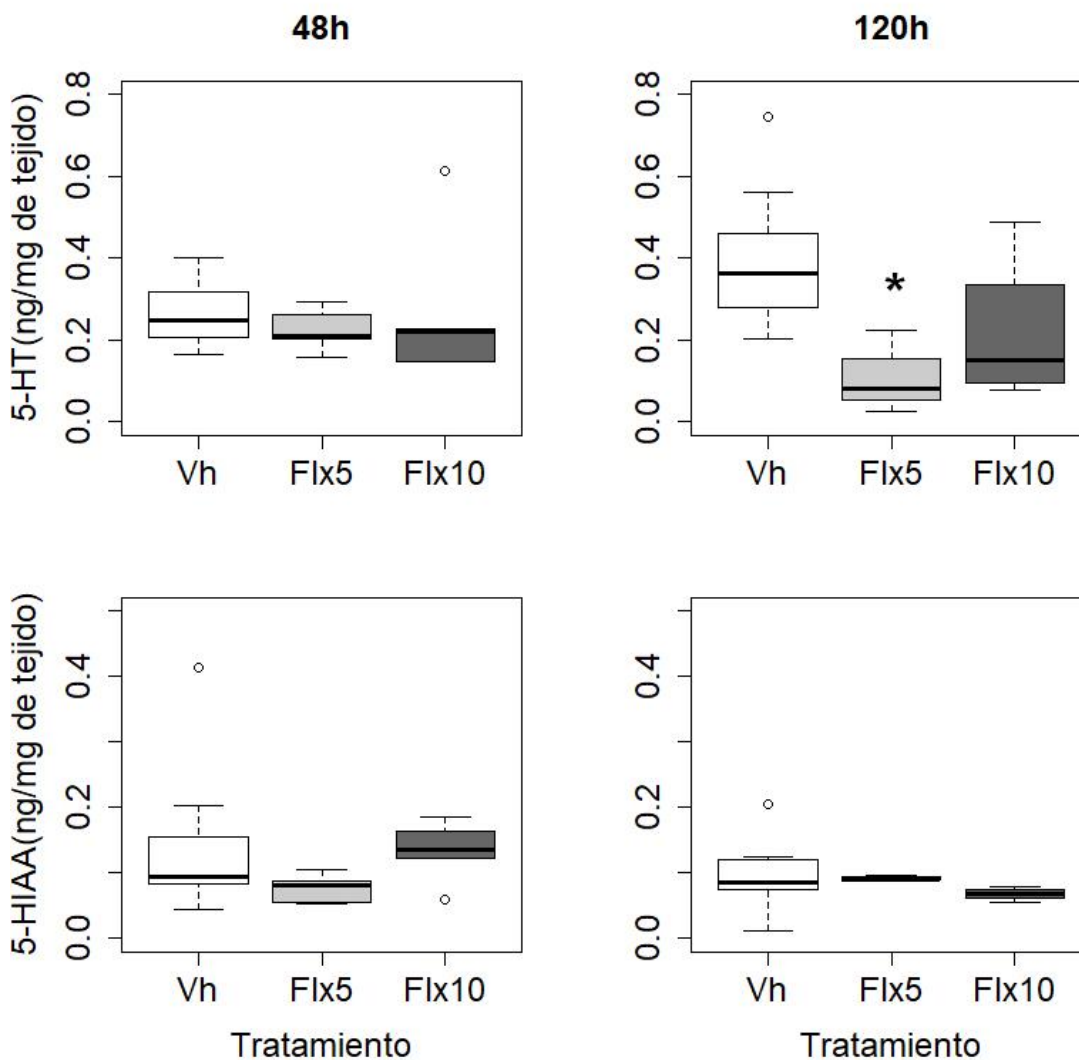


Figura 17. Concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con Flx, 5 mg/kg (Flx5) o 10 mg/kg (Flx10) de peso corporal a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. Los diagramas de caja muestran la mediana (línea negra gruesa) y el primer y tercer cuartil (límites inferior y superior de la caja respectivamente), los valores atípicos son representados con los círculos pequeños. *p < 0.0207 vs. Vh (t Student).

2.2 Flx y concentración sérica de testosterona y estradiol

La concentración de testosterona en el suero de los animales inyectados con Flx5 disminuyó a las 48h postratamiento en comparación con su respectivo grupo Vh. La concentración de estradiol no se modificó en ninguna de las edades estudiadas (**Figura 18**).

2.3 Flx y población folicular

En comparación con los animales que recibieron Vh, la proporción de folículos preovulatorios atrésicos aumentó en el grupo de animales con Flx5 y autopsiados a las 48h postratamiento y a las 120h en el grupo con Flx10 (**Figura 19**).

Cuando se evaluó la proporción de folículos con células de la granulosa positivas a TUNEL se observó que en los animales tratados con Flx5 y Flx10, y terminados a las 120h la proporción de folículos con marca moderada disminuyó en los folículos pequeños, medianos y preovulatorios, mientras que la de folículos con marca intensa aumentó, en comparación con sus respectivos grupos con Vh (**Figura 20**).

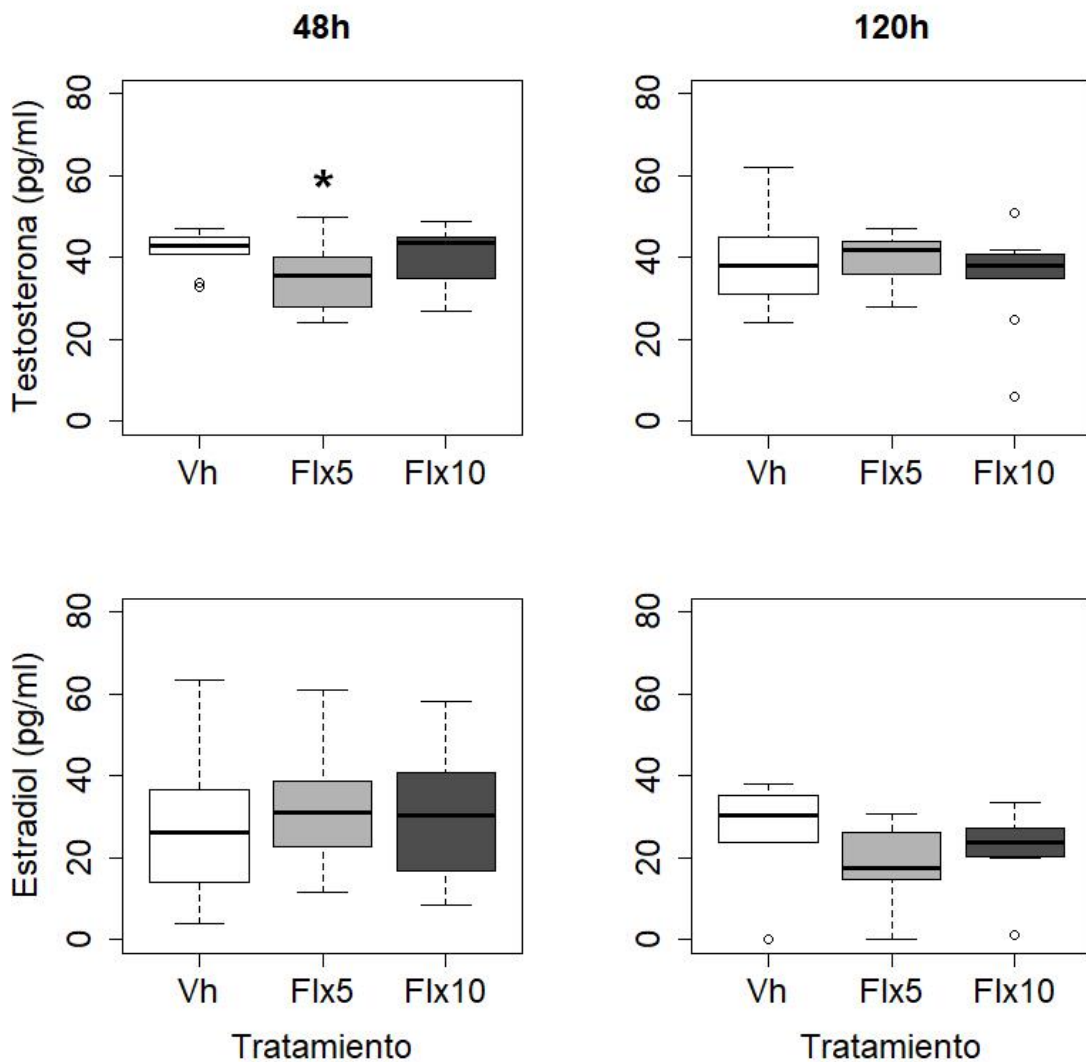


Figura 18. Concentración de testosterona y de estradiol en el suero de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con Flx, 5 mg/kg (Flx5) o 10 mg/kg (Flx10) de peso corporal a los 30 días de edad y terminadas a las 48 o 120h postratamiento. Los diagramas de caja muestran la mediana (línea negra gruesa) y el primer y tercer cuartil (límites inferior y superior de la caja respectivamente), los valores atípicos son representados con los círculos pequeños. *p < 0.05 vs. Vh (t Student).

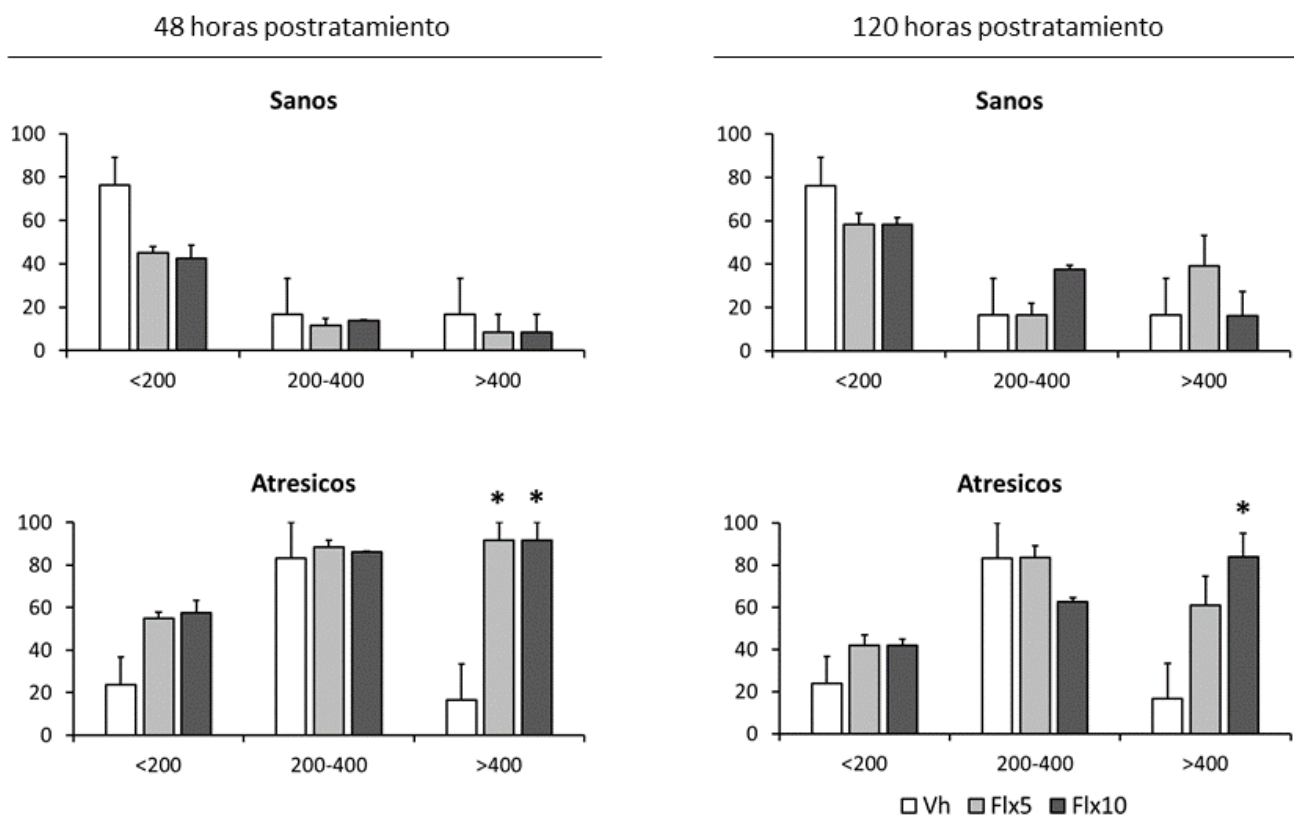


Figura 19. Proporción de folículos sanos y atresicos en el ovario de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 5 o 10 mg/Kg de Flx (Flx5 y Flx10 respectivamente) disuelta en solución salina, y terminados 48 o 120h postratamiento. *p<0.05 vs. Vh (t Student).

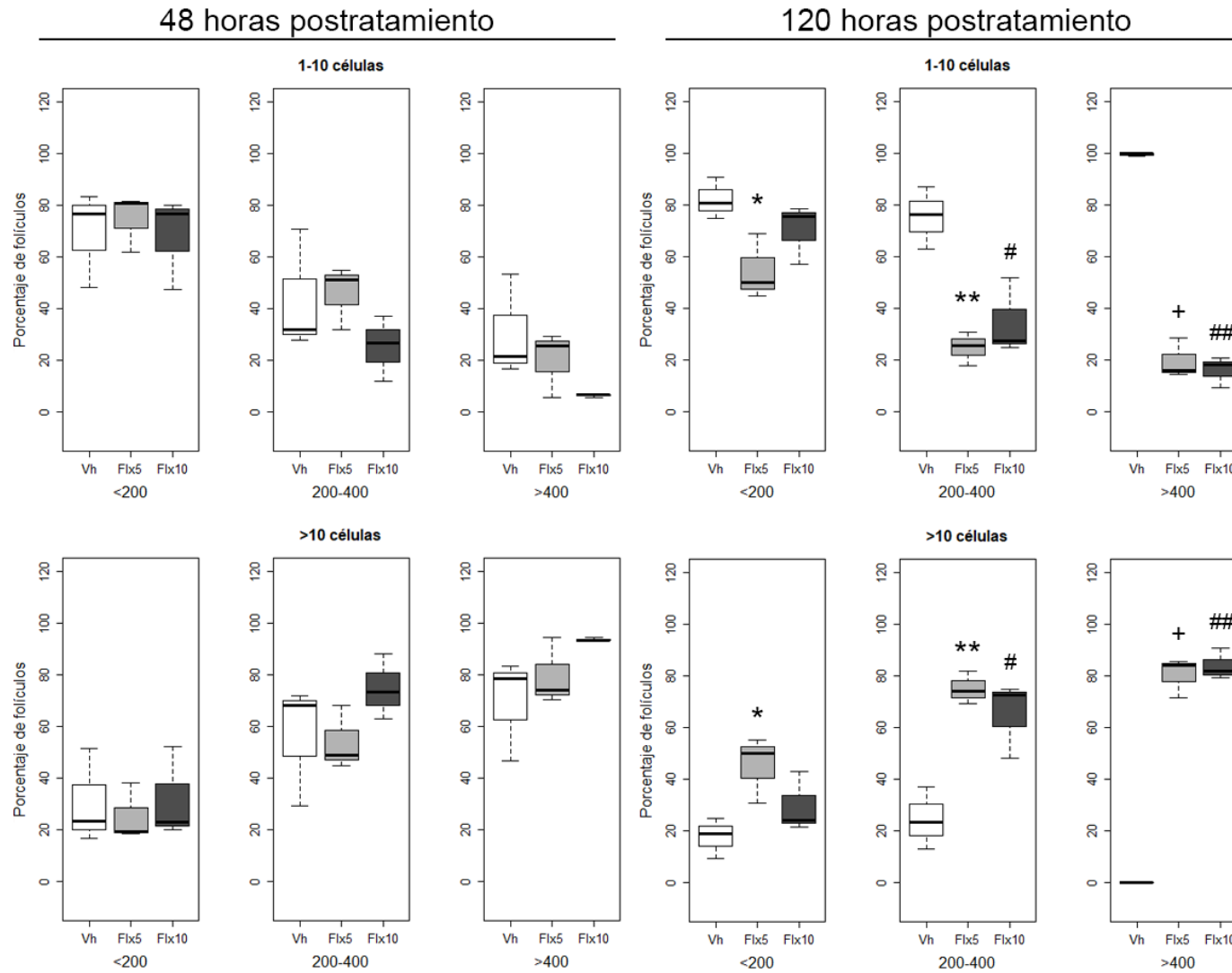


Figura 20. Proporción de folículos con células de la granulosa positivas a TUNEL (Marca moderada: 1-10 células positivas; marca intensa: > 10 células positivas), en folículos (Pequeños: <200 μm; medianos: 200-400 μm; preovulatorios: >400 μm) en el ovario de ratas inyectadas con solución salina (0.9% NaCl) (Vh) o con 5 o 10 mg/Kg de Flx (Flx5 y Flx10 respectivamente) disuelta en solución salina, y terminados 48 o 120h postratamiento. *p <0.0001 vs. Vh (t Student).

2.4 Flx y presencia de las proteínas Bax, Caspasa 3 y R5-HT7

La expresión de la proteína Bax no se modificó en los grupos de animales con Flx5 o Flx10 en relación a su grupo con Vh (Figura 21 A y B). La presencia de la caspasa-3 activa disminuyó en los grupos de animales con Flx5 o Flx10 y autopsiados 120h postratamiento, en comparación con su respectivo grupo con Vh (Figura 21 C y D). La presencia del R5-HT7 no se modificó en ninguno de los grupos inyectados con Flx (Figura 21 E y F).

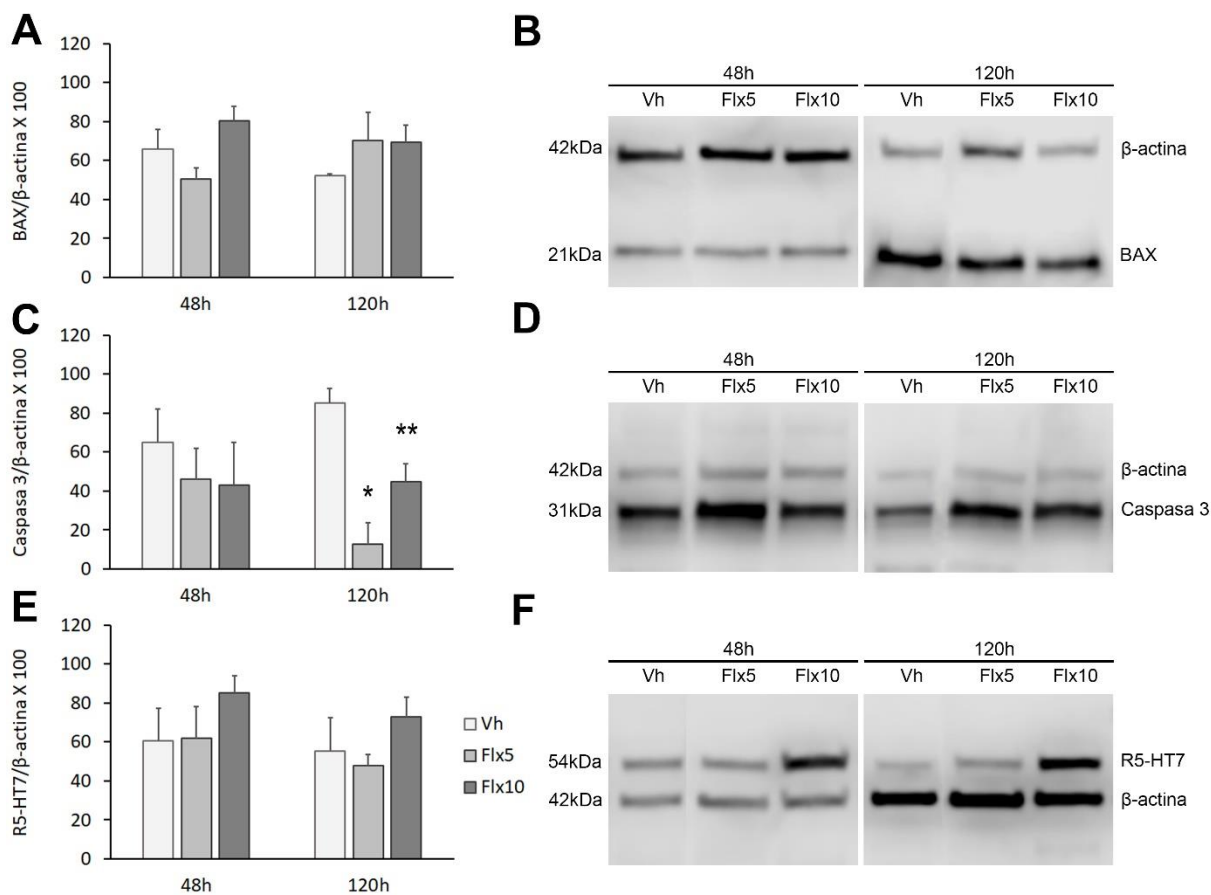


Figura 21. Expresión de las proteínas BAX (A, B), Caspasa 3 (C, D), y el R5-HT7 (E, F). La expresión de proteínas fue evaluada en el ovario de ratas inyectadas por vía intraperitoneal con solución de NaCl al 0.9% (Vh) o con 5 o 10 mg/Kg de Flx (Flx5 y Flx10 respectivamente) disuelta en solución salina, y terminados 48 o 120h postratamiento (A, C, E). La expresión de las proteínas fue normalizada con β-actina (B, D,F) *p 0.0003 **p 0.0154 vs. Vh (t Student).

VI. DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que la inhibición o estimulación del sistema serotoninérgico inducido por la administración de la pCA o FLX, respectivamente incrementan la atresia folicular, el número de células de la granulosa positivas a TUNEL, en apoptosis. La pCA también disminuye la producción de estradiol, factor de sobrevivencia de las células foliculares.

El aumento en la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio de los animales del grupo Vh a las 120h puede ser resultado del estrés ocasionado por la manipulación y la inyección de solución salina. En situaciones de estrés, se estimula la secreción de la hormona adenocorticotrópica, que promueve la liberación de corticosterona por las adrenales [138], que va a estimular la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa (enzima limitante en la síntesis de 5-HT) y la inhibición de la actividad de la monoaminoxidasa (enzima que metaboliza a la 5-HT), lo cual resulta en el aumento en la concentración de 5-HT en el cerebro [139–141].

1. Inhibición del sistema serotoninérgico

La disminución en la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio, de los animales inyectados con pCA, se debe a la acción de la anfetamina en las neuronas serotoninérgicas que conforman los NRD y NRM y que inervan al hipotálamo [4,26]. El efecto inhibitorio de la pCA en el sistema serotoninérgico del SNC se ha demostrado previamente [110–112,142] y es el resultado de la inhibición de la enzima triptófano hidroxilasa [110,111], limitante en la síntesis de 5-HT [19]. Efecto que es evidente a partir de las 48h después del tratamiento y se mantiene hasta por 30 días.

En el presente estudio, mostramos que, a diferencia de lo observado en el hipotálamo, la pCA tiene dos acciones diferentes en el sistema serotoninérgico del ovario dependiendo del tiempo transcurrido después de su administración. En la primera etapa, a las 48h posteriores a la inyección de pCA, la concentración de 5-HT aumentó. Mientras que en el SNC, este efecto se presenta en las primeras 24 h [108]. En relación al ovario, no existe inervación serotoninérgica y las fuentes de 5-HT del órgano son las plaquetas, los mastocitos y la síntesis *de novo*. Por ello, es posible pensar que el incremento en la concentración de 5-HT que se observó en el ovario de los animales que se les inyectó pCA y autopsiados a las 48h postratamiento es el resultado de

la liberación de las reservas de 5-HT en las plaquetas, efecto que previamente fue mostrado por Martín y Artigas [143]. Cuando se mantiene las plaquetas *In vitro* y al medio de cultivo se le adiciona pCA se estimula el eflujo de la 5-HT ocasionando la liberación del 56% de la amina [144].

En la segunda etapa, en el ovario disminuye la concentración de 5-HT a las 120h postratamiento. En nuestro estudio no se evaluó el lapso comprendido entre las 48h y antes de las 120h, por ello no podemos descartar que la disminución en la concentración de 5-HT iniciara antes de las 120h. El efecto inhibitorio de la pCA sobre la síntesis de 5-HT en el ovario se presenta después que en el SNC. Esto posiblemente se relaciona con la isoforma de la TPH presente en ambas regiones, en el SNC se encuentra la TPH2, que es más sensible a los efectos de las anfetaminas [145], y en el ovario se identifica la TPH1 [5] que es más resistente a estas sustancias [145].

Se ha mostrado que la 5-HT participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y como consecuencia en las funciones del ovario, como la esteroidogénesis [75]. En el presente estudio la desregulación en el sistema serotoninérgico del hipotálamo y del ovario resultó en la disminución en la concentración de estradiol a las 48 o 120h postratamiento, sin que se modificara la concentración de testosterona, lo anterior puede ser el resultado de la disminución en la actividad de la enzima p450 Aromatasa, que es responsable de la transformación de la testosterona a estradiol [48]. La FSH, al unirse a sus receptores en las células de la granulosa promueve la esteroidogénesis al activar la enzima p450 Aromatasa. La disminución en la actividad de esta enzima posiblemente se debe a: 1. La modificación en la secreción de FSH o 2. La disponibilidad de esta hormona para el ovario [146].

La idea de que en los animales inyectados con pCA la disminución en la producción de estradiol se asocia a la acción de la FSH se sustenta en las evidencias que muestran que la 5-HT ejerce un papel estimulante en la regulación de la secreción de FSH [75,147]. En la rata hembra prepúber, la administración de 5-hidroxitriptófano, precursor de la síntesis de 5-HT [147], o de la amina [75] incrementan la concentración sérica de FSH. Por ello es posible que la disminución en la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio donde se localizan los somas y terminales de las neuronas secretoras de GnRH, respectivamente [38,148], modificara la producción de FSH por la hipófisis lo que se acompañó de la disminución de la actividad de la p450 Aromatasa en el ovario y de la transformación de testosterona a estradiol.

Otra posibilidad es que la desregulación de la concentración de 5-HT en el ovario disminuyera la disponibilidad de FSH para la gónada y la esteroidogénesis. El aumento en la concentración de 5-HT del ovario a las 48h después de la administración de pCA, posiblemente generó la vasoconstricción de la arteria ovárica y de los vasos que irrigan al ovario, disminuyendo el aporte de la FSH, lo que ocasionó la disminución en la actividad de la enzima p450 Aromatasa y la transformación de testosterona a estradiol. Esta idea se apoya en las evidencias que muestran que la 5-HT induce vasoconstricción en las arterias que irrigan al hígado, riñón y testículo [149,150].

El efecto estimulante de la 5-HT en la síntesis de estradiol por el folículo ovárico se ha reportado en la rata [2,151] y en humanos [152,153]. Por ello, no se descarta que la pCA actuara directamente sobre el sistema serotoninérgico del ovario inhibiéndolo y como consecuencia modificara la producción de estradiol. El hecho de que en los animales que se les administró pCA, las concentraciones de 5-HT en el ovario y de estradiol en suero disminuyeran apoya esta idea.

En el ovario la relación de la 5-HT con la regulación de la esteroidogénesis es poco clara. La SERT que transporta la 5-HT al interior de la neurona o la célula que la libera [154], está presente en las células foliculares y el ovocito de ratón [155]. La SERT es blanco de la pCA [156,157]. En el SNC de la rata macho, la pCA disminuye la expresión de la SERT [157] y su unión a la 5-HT [156]. En el ratón hembra Knockout para la proteína SERT o con inhibición farmacológica de la SERT, disminuye la expresión de la aromatasa en el ovario y la concentración de estradiol. Lo anterior sustenta que la 5-HT vía la SERT participa en la regulación de la esteroidogénesis por el ovario al modificar la enzima P450 Aromatasa [158].

Aunado a lo anterior, en el trofoblasto de la mujer, la unión de la 5-HT a su receptor 5-HT_{2A} activa a la enzima Aromatasa [159–162]. Conjuntamente nuestros resultados y las evidencias antes reportadas sustentan la idea de que la disminución en la concentración de estradiol puede ser el resultado de la disminución de la actividad de la enzima p450 Aromatasa.

El presente trabajo es el primero que proporciona evidencias que la desregulación del sistema serotoninérgico del ovario, con pCA o Fluoxetina, incrementa la apoptosis de las células de la granulosa e induce la atresia folicular. La 5-HT vía su unión a los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂ regula la producción de estradiol [2,163]. En el ovario de ratón, estos receptores se han detectado en

el ovocito y en las células de la granulosa del cumulus [5]. Lo anterior muestra que las células de la granulosa son blanco de la 5-HT. En nuestro estudio identificamos el R5-HT7, tanto en el ovocito como en las células de la granulosa en los folículos en sus diferentes etapas del desarrollo, en los preovulatorios principalmente en las células de la granulosa del cumulus. No existen evidencias de que la unión de la 5-HT a este receptor active vías de señalización que regulen la esteroidogénesis, hecho que requiere estudios futuros, sin embargo, no se puede descartar este aspecto.

El aumento en la proporción de folículos atrésicos observado en los animales a los que se les administró pCA, podría ser resultado de la disminución en la concentración de estradiol, hormona que induce el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico, al promover la progresión del ciclo celular y la mitosis de las células de la granulosa [16,164].

El incremento en la atresia folicular que se observó en los animales que se inyectaron con pCA es el resultado de que se activó alguna vía de señalización que condujo a la muerte por apoptosis de las células de la granulosa en los folículos en sus diferentes etapas de desarrollo. La atresia folicular se asocia a la muerte por apoptosis de las células de la granulosa y del ovocito [165,166]. Este proceso es regulado por factores inhibidores de la apoptosis FSH, progesterona, estradiol, el IGF-I y II entre otros; así como por los factores inductores, testosterona y el factor de crecimiento transformante β [167–169].

La disminución en la concentración de estradiol que se observó en los animales tratados con pCA se acompañó del aumento en el número de folículos de 200-400 μm y >400 μm de diámetro con más de 10 células de la granulosa positivas a TUNEL (marca intensa), lo que indica que el incremento en la atresia folicular es debido al aumento en la muerte por apoptosis de las células de la granulosa en respuesta a la disminución en la concentración de estradiol, factor de sobrevivencia de las células de la granulosa [170]. Observaciones similares se han reportado cuando a ratas se les administra un anti-estrogeno (citrato de clomifeno), lo que resulta en el aumento de la expresión de la proteína proapoptótica Bax y de apoptosis en las células de la granulosa del cumulus, y este efecto se revierte cuando además del anti-estrógeno se administra estradiol [17]. También se ha reportado que cuando en la rata se administra bisfenol-A, disminuye la concentración de estradiol en suero, y en los ovarios la expresión de la Aromatasa p450, y aumenta la proteína apoptótica, caspasa 3 [171].

Otra posibilidad es que el aumento en la apoptosis de las células de la granulosa puede ser el resultado de la desregulación de la concentración de 5-HT del ovario, ya que a esta amina se le ha asociado con la apoptosis en diferentes tejidos [6], y actúa como inductor o inhibidor de la apoptosis en función del receptor a 5-HT que se esté expresando. Cuando la 5-HT se une al receptor 5-HT₂, se activa la caspasa 3 y se induce la apoptosis en neuronas corticales de rata [11], y en los hepatocitos de ratón se induce la apoptosis vía la disminución de Bcl-2 y aumento en la expresión de Bax [172]. Cuando se estimulan los receptores 5-HT₁ y 5-HT₇ en monocitos humanos, aumenta la expresión de Bcl-2 y Mcl-1, se inhibe la activación de la caspasa 3 y la apoptosis [173]. En el ovario no existen evidencias si la unión de la 5-HT al receptor 5-HT₇ activa vías de señalización asociadas con la proliferación celular o apoptosis en las células de la granulosa del folículo ovárico. El aumento en el número de células positivas a TUNEL en los folículos y de la atresia folicular que se observó en los ovarios de los animales tratados con pCA no se acompañó de cambios en la expresión de la proteína del R5-HT7. Esta aparente falta de cambios posiblemente se debe a que los bioensayos que se realizaron en el presente estudio incluyeron todos los componentes celulares que conforman el ovario, y no se evaluó exclusivamente en las células de la granulosa la expresión de esta proteína.

El aumento en la expresión de la proteína proapoptótica Bax a las 120h puede ser resultado de la disminución en la concentración de estradiol, factor de sobrevivencia de las células foliculares, que estimula la producción de la proteína antiapoptótica Bcl-2 e inhibe la transcripción de los genes proapoptóticos p53 y Bax [16,174]. La disminución en la concentración de estradiol posiblemente resultó en el desbalance en la síntesis de Bcl-2 y Bax, favoreciendo la activación de caspasas, fragmentación de ADN y finalmente la atresia del folículo.

Las caspasas 3, 6 y 7 efectoras de la apoptosis activan la caspasa activadora de la DNasa, que es la responsable de la fragmentación del ADN en fragmentos de 180-200 pb [169,170]. En este estudio el aumento en la apoptosis en las células de la granulosa no se acompaña de cambios significativos en la presencia de la caspasa 3 activa. Se reporta que la apoptosis se puede producir independientemente de la activación de la caspasa 3 [175,176]. Esta idea es apoyada por los estudios en los que se muestra que en cultivo en las células de ovario de hámster [175] y en las células de cáncer de glándula mamaria (MCF-7) se produce apoptosis sin activación de la caspasa 3, pero sí se activa a la caspasa 7 [176]. Con base en estas evidencias es posible

pensar que en los animales que se les administro pCA, la disminución de la concentración de estradiol conduce al aumento en la expresión de Bax, y a la fragmentación de ADN por una vía independiente a la actividad de la caspasa 3, lo que culmina con el aumento de células positivas a TUNEL y de la atresia folicular en las diferentes etapas de desarrollo.

Con base en los resultados de la inhibición del sistema serotoninérgico, mostramos que los derivados de las anfetaminas inducen desregulación del sistema serotoninérgico del hipotálamo y del ovario, lo que impacta negativamente en la producción de estradiol, hormona que estimula la mitosis, la sobrevivencia de las células de la granulosa, y el crecimiento del folículo ovárico.

2. Estimulación del sistema serotoninérgico

En los animales que fueron tratados con Flx observamos que en el hipotálamo medio aumentó la concentración de 5-HT a las 48h postratamiento, lo que indica que obtuvimos la respuesta estimulante del sistema serotoninérgico por la administración del fármaco. La disminución en la concentración de 5-HT y del 5-HIAA a las 120h en el hipotálamo anterior y medio en los animales que recibieron Flx puede ser resultado del efecto inhibitorio que ejerce la Flx sobre la TPH, lo que resulta en la disminución en la síntesis de 5-HT y en consecuencia de su metabolito. Existen evidencias que muestran que cuando ratas machos son tratadas con Flx (5mg/Kg), disminuye el número de células que expresan a la TPH en los núcleos NRD y NRM [177], considerando que el NRD es la región que posee la mayor cantidad de somas de neuronas productoras de 5-HT y que estas envían sus proyecciones hacia el hipotálamo, siendo su principal fuente de 5-HT [178]. En conjunto nuestros resultados y lo reportado en bibliografía nos permiten sugerir que en los animales que recibieron Flx disminuyó la síntesis de 5-HT como resultado de la inhibición de la TPH.

Como ya se mencionó, la 5-HT en el SNC participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, y en consecuencia en las funciones del ovario (esteroidogénesis y el desarrollo folicular) [75]. En nuestro estudio, la administración de Flx resultó en la disminución en la concentración de testosterona únicamente en los animales del grupo Flx5 a las 48h postratamiento. Se ha mostrado en estudios en pacientes con depresión y que reciben tratamiento con Flx, que la concentración de 5-HT puede aumentar o disminuir en relación a la concentración que presentaban al inicio del tratamiento, sin embargo, los autores no descartan que estas variaciones sean resultado de la pulsatilidad en la secreción de la testosterona [179].

En otro estudio realizado en pacientes humanos, se mostró que en aquellos que habían estado en tratamiento con Flx por más de 6 meses disminuye la concentración de testosterona en suero [180]. También se ha reportado que, en ratas macho, el tratamiento con Flx disminuye la concentración en suero de progesterona, testosterona y estradiol, siendo esta disminución significativa únicamente en la concentración de estradiol [181]. Sin embargo, aunque estas evidencias muestran que la administración de Flx por periodos largos pueden modificar la síntesis de hormonas esteroides, no nos ayudan a explicar porque se presentó la disminución en la concentración de testosterona únicamente en el grupo Flx5 a las 48h postratamiento.

El aumento en la proporción de folículos atrésicos que se observó en los animales que fueron tratados con Flx, podría ser resultado de la acción de la Flx sobre las células foliculares, ya que se ha mostrado que puede atravesar la membrana celular y se ha encontrado en la mitocondria de diferentes tipos celulares, como neuronas y células hepáticas [182]. También se ha mostrado que la Flx en cultivo de células GC-1 y GC-2 (Lineas celulares de espermatogonias y espermatocitos de ratón respectivamente) disminuye la producción de ATP y proteínas involucradas en la regulación del ciclo celular (p16, p21, p27, p53), que conduce al arresto del ciclo celular y muerte celular por apoptosis [183].

El aumento de folículos preovulatorios con mas de 10 células de la granulosa positivas a TUNEL (marca intensa), podría ser resultado de la disminución en la concentración de 5-HT del ovario, ya que a esta amina se le ha asociado con la apoptosis en diferentes tejidos [184], donde puede actuar como inductor o inhibidor de la apoptosis en función del receptor a 5-HT que se esté expresando [172,173], ya que existen evidencias que señalan que la estimulación del receptor a serotonina 5-HT₂ induce la apoptosis [185,186] mientras que los receptores 5-HT₁ y 5-HT₇ la inhiben [173], por lo que podemos pensar que al disminuir la concentración de 5-HT disminuye la señalización que induce la sobrevivencia de estos folículos. También es posible pensar que el aumento en la apoptosis en los folículos preovulatorios sea resultado de la disminución en la expresión de los receptores asociados a la inhibición de la apoptosis, como es el receptor 5-HT₁, el cual se ha mostrado que en monocitos humanos aumenta la expresión de la proteína antiapoptótica Bcl-2 e inhibe la expresión de la caspasa 3 y la apoptosis [173], esta idea se apoya en evidencias en las que se ha mostrado que la Flx inhibe la expresión de los receptores 5-HT₁ en el hipocampo y en el rafe dorsal de ratas [187]. Sin embargo, hasta el momento no existen

evidencias que indiquen que en el ovario el receptor 5-HT₁ active vías de señalización asociadas con la apoptosis de las células de la granulosa. También existe controversia sobre el efecto de la Flx en la expresión de los receptores 5-HT₁, ya que algunos autores mencionan que tiene un efecto inhibitorio [188,189], mientras que otros mencionan que no tiene efectos sobre este receptor [190–192].

La disminución de la expresión de la caspasa 3 a las 120h postratamiento puede ser resultado del efecto antiapoptótico que se ha reportado que puede tener la Flx, el cual se ha mostrado en un modelo de isquemia cerebral en ratas, en el que se induce la apoptosis de las neuronas y al administrar Flx se reduce el daño, disminuye la expresión de proteínas proapoptóticas, entre ellas la caspasa 3 [193], lo que permite pensar que podría estar ocurriendo en los ovarios de nuestros animales. Sin embargo, este efecto inhibitorio de la apoptosis es contrario a lo observado en nuestros resultados de atresia y apoptosis, las cuales aumentan, es factible pensar que la apoptosis puede estarse activando por una vía independiente de la caspasa 3, posiblemente activando la caspasa 7, la cual también es una caspasa efectora de la apoptosis y esta vía ya ha sido reportada previamente [175,176].

Los resultados del presente estudio muestran que la estimulación del sistema serotoninérgico con Flx induce la desregulación del sistema serotoninérgico del hipotálamo y del ovario, lo que impacta negativamente la sobrevivencia de las células foliculares y el desarrollo folicular.

De forma conjunta, los resultados de la estimulación y la inhibición del sistema serotoninérgico, muestran que el uso de sustancias con actividad serotoninérgica en la etapa prepuberal tiene un efecto negativo en las funciones del ovario, impactando en la síntesis de hormonas esteroideas y en el desarrollo folicular, lo que podría conducir a problemas de fertilidad durante la etapa adulta de los individuos, por lo que sería relevante realizar el estudio de los efectos que tiene el consumo de esas sustancias durante la vida reproductiva de los adultos.

3. Limitaciones del estudio

Algunas de las limitaciones del presente estudio y que generan áreas de oportunidad para continuar con la investigación de los efectos de la inhibición o estimulación del sistema serotoninérgico del ovario son:

- En los resultados de la evaluación de la concentración de serotonina en hipotálamo y ovario no logramos observar el efecto estimulante de la fluoxetina, donde pensamos que el efecto estimulante pudo haberse presentado entre el momento de su administración y antes de las 48 horas, razón por la que este efecto no se observa en nuestros resultados, por ello consideramos que sería importante realizar la evaluación de la concentración de serotonina y su metabolito a diferentes horas después de su administración (p.ej. 2h, 4h, 6h, y 24h después de su administración)
- El desarrollo del folículo ovárico y la sobrevivencia de las células foliculares también es regulado por las gonadotropinas. Este aspecto no fue el objetivo del presente trabajo. Sin embargo, sería relevante hacer la cuantificación de las gonadotropinas, principalmente de la FSH, con la finalidad de contar con un panorama más completo sobre si los efectos de la desregulación del sistema serotoninérgico afectan únicamente al ovario, producción de estradiol o también a la hipófisis, secreción de FSH. Hormonas que son claves en el mantenimiento de la sobrevivencia de las células foliculares y el desarrollo folicular.
- En el presente estudio mostramos que la desregulación del sistema serotoninérgico del ovario induce el aumento de la apoptosis de las células de la granulosa y atresia de los folículos. Sin embargo, surgen las interrogantes respecto a la vía de señalización que se activa y que conduce a la muerte de las células foliculares, aunado a esto, el hecho del que no se observarán cambios en la presencia de la caspasa 3 activa, dejan abierta la necesidad de evaluar otras moléculas claves en el proceso de apoptosis, como la caspasa 7.
- En presente trabajo es el primer reporte de la presencia del receptor 5-HT7 el ovario de la rata, aunque no observamos modificaciones en su expresión esto puede ser resultado de que la evaluación se realizó en el homogenizado del ovario completo y presencia de este receptor esta limitada al ovocito y a las células de la granulosa del cumulus, por lo que sería relevante hacer la evaluación de su expresión en estos tipos celulares, y en folículos en diferentes etapas de desarrollo. Además de evaluar otros receptores a serotonina que se expresen en el ovario de la rata, como el 5-HT1 y 5-HT2 que están involucrados en la regulación de la apoptosis en otros tejidos.

VII. CONCLUSIONES

En la rata hembra prepúber la inhibición del sistema serotoninérgico:

- Induce la muerte de las células de la granulosa y la atresia de los folículos en sus diferentes etapas de desarrollo.
- Disminuye la concentración de estradiol sin modificar la concentración de testosterona.
- Induce la expresión de BAX en las células del ovario sin modificar la expresión de la caspasa 3.
- No modifica la expresión del receptor 5-HT₇

En la rata hembra prepúber la estimulación del sistema serotoninérgico:

- Induce la muerte celular por apoptosis de las células de la granulosa en los folículos en diferentes etapas de su desarrollo
- Induce la atresia en los folículos preovulatorios.
- Inhibe la expresión de la caspasa-3 en el tejido ovárico y no modifica la expresión de BAX.
- No modifica la expresión del receptor 5-HT₇.

VIII. REFERENCIAS

- [1] P. Amireault, F. Dubé, Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 358–365. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.039313>.
- [2] E. Tanaka, N. Baba, K. Toshida, K. Suzuki, Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor, *Life Sci.* 53 (1993) 563–570. [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90713-d](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90713-d).
- [3] G. Meresman, [Relevance of apoptosis in the female reproductive system], *Invest. Clin.* 52 (2011) 274–290.
- [4] 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. <https://doi.org/10.1002/ar.1092330315>.
- [5] F. Dubé, P. Amireault, Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos, *Life Sci.* 81 (2007) 1627–1637. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.034>.
- [6] E.C. Azmitia, Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis, *Brain Res. Bull.* 56 (2001) 413–424. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00614-1](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00614-1).
- [7] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516. <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- [8] K.G. Rajesh, R. Suzuki, H. Maeda, Y. Murio, S. Sasaguri, 5-HT₂ receptor blocker sarpogrelate prevents downregulation of antiapoptotic protein Bcl-2 and protects the heart against ischemia-reperfusion injury, *Life Sci.* 79 (2006) 1749–1755. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.06.026>.
- [9] E.C. Azmitia, R.B. Murphy, P.M. Whitaker-Azmitia, MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: evidence for Ca²⁺(+)-dependent toxicity linked to release, *Brain Res.* 510 (1990) 97–103. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90732-q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90732-q).
- [10] E.M. Gouveia, C.R. Franci, Involvement of serotonin 5HT₁ and 5HT₂ receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion, *Brain Res. Bull.* 63 (2004) 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.03.002>.
- [11] J.P. Capela, E. Fernandes, F. Remião, M.L. Bastos, A. Meisel, F. Carvalho, Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons, *Neurotoxicology.* 28 (2007) 868–875. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.04.005>.
- [12] E. Markström, E.C. Svensson, R. Shao, B. Svanberg, H. Billig, Survival factors regulating ovarian apoptosis -- dependence on follicle differentiation, *Reprod. Camb. Engl.* 123 (2002) 23–30. <https://doi.org/10.1530/rep.0.1230023>.
- [13] J.Y. Choi, M.W. Jo, E.Y. Lee, B.-K. Yoon, D.S. Choi, The role of autophagy in follicular development and atresia in rat granulosa cells, *Fertil. Steril.* 93 (2010) 2532–2537. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.11.021>.
- [14] K.A. Slot, M. Voorendt, M. de Boer-Brouwer, H.H. van Vugt, K.J. Teerds, Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary, *J. Endocrinol.* 188 (2006) 179–192. <https://doi.org/10.1677/joe.1.06165>.
- [15] J.L. Tilly, K.I. Tilly, M.L. Kenton, A.L. Johnson, Expression of members of the bcl-2 gene family in the immature rat ovary: equine chorionic gonadotropin-mediated inhibition of granulosa cell apoptosis is associated with decreased bax and constitutive bcl-2 and bcl-xlong messenger ribonucleic acid levels, *Endocrinology.* 136 (1995) 232–241. <https://doi.org/10.1210/endo.136.1.7828536>.
- [16] F. Matsuda, N. Inoue, N. Manabe, S. Ohkura, Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells, *J. Reprod. Dev.* 58 (2012) 44–50. <https://doi.org/10.1262/jrd.2011-012>.

- [17] S.K. Chaube, P.V. Prasad, S.C. Thakur, T.G. Shrivastav, Estradiol protects clomiphene citrate-induced apoptosis in ovarian follicular cells and ovulated cumulus-oocyte complexes, *Fertil. Steril.* 84 Suppl 2 (2005) 1163–1172. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.073>.
- [18] E. Gallegos Pacheco, 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, Universidad Nacional Autónoma de México, 2007. https://ru.dgb.unam.mx/handle/DGB_UNAM/TES01000616561 (accessed January 13, 2022).
- [19] E.C. Azmitia, Serotonin, ELS John Wiley Sons Ltd. (2012). <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0000124.pub2>.
- [20] M.C. Boadle-Biber, Regulation of serotonin synthesis, *Prog. Biophys. Mol. Biol.* 60 (1993) 1–15. [https://doi.org/10.1016/0079-6107\(93\)90009-9](https://doi.org/10.1016/0079-6107(93)90009-9).
- [21] E. Sanders-Bush, C.D. Nichols, 23 - Serotonin Receptors and Neurotransmission, in: D. Robertson, I. Biaggioni, G. Burnstock, P.A. Low (Eds.), *Primer Auton. Nerv. Syst. Second Ed.*, Academic Press, San Diego, 2004: pp. 93–VII. <https://doi.org/10.1016/B978-012589762-4/50024-4>.
- [22] E. Layunta, B. Buey, J.E. Mesonero, E. Latorre, Crosstalk Between Intestinal Serotonergic System and Pattern Recognition Receptors on the Microbiota–Gut–Brain Axis, *Front. Endocrinol.* 12 (2021). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fendo.2021.748254> (accessed May 31, 2022).
- [23] M. Pierucci, S. Chambers, L. Partridge, P. De Deurwaerdère, G. Di Giovanni, Role of Central Serotonin Receptors in Nicotine Addiction, in: R.A.J. Lester (Ed.), *Nicotinic Recept.*, Springer, New York, NY, 2014: pp. 279–305. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1167-7_14.
- [24] C.D. Nichols, E. Sanders-Bush, Serotonin, in: M.J. Aminoff, R.B. Daroff (Eds.), *Encycl. Neurol. Sci.*, Academic Press, New York, 2003: pp. 245–248. <https://doi.org/10.1016/B0-12-226870-9/01992-4>.
- [25] R.R. Ramsay, A. Albrecht, Kinetics, mechanism, and inhibition of monoamine oxidase, *J. Neural Transm. Vienna Austria* 1996. 125 (2018) 1659–1683. <https://doi.org/10.1007/s00702-018-1861-9>.
- [26] J.P. Ruddick, A.K. Evans, D.J. Nutt, S.L. Lightman, G.A.W. Rook, C.A. Lowry, Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications, *Expert Rev. Mol. Med.* 8 (2006) 1–27. <https://doi.org/10.1017/S1462399406000068>.
- [27] K. Beecher, A. Belmer, S.E. Bartlett, Chapter 6 - Anatomy of the Serotonin Transporter, in: P.M. Pilowsky (Ed.), *Serotonin*, Academic Press, Boston, 2019: pp. 121–133. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-800050-2.00006-1>.
- [28] G. Bonvento, E.T. MacKenzie, 22 - Serotonin and Its Receptors, in: K.M.A. Welch, L.R. Caplan, D.J. Reis, B.K. Siesjö, B. Weir (Eds.), *Primer Cerebrovasc. Dis.*, Academic Press, San Diego, 1997: pp. 80–82. <https://doi.org/10.1016/B978-012743170-3.50023-6>.
- [29] J. Hannon, D. Hoyer, Serotonin receptors and systems: endless diversity?, *Acta Biol. Szeged.* 46 (2002) 1–12.
- [30] J.M. Palacios, Serotonin receptors in brain revisited, *Brain Res.* 1645 (2016) 46–49. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2015.12.042>.
- [31] M. Pytliak, V. Vargova, V. Mechírová, M. Felšöci, Serotonin Receptors – From Molecular Biology to Clinical Applications, *Physiol. Res. Acad. Sci. Bohemoslov.* 60 (2010) 15–25. <https://doi.org/10.33549/physiolres.931903>.
- [32] D. Hoyer, Chapter Four - Serotonin receptors nomenclature, in: M.D. Tricklebank, E. Daly (Eds.), *Serotonin Syst.*, Academic Press, 2019: pp. 63–93. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-813323-1.00004-9>.
- [33] I. Cinar, B. Sirin, Z. Halici, S.S. Palabiyik-Yucelik, E. Akpinar, E. Cadirci, 5-HT7 receptors as a new target for prostate cancer physiopathology and treatment: an experimental study on PC-3 cells and FFPE tissues, *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 394 (2021) 1205–1213. <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02051-z>.
- [34] L.F. Mohammad-Zadeh, L. Moses, S.M. Gwaltney-Brant, Serotonin: a review, *J. Vet. Pharmacol. Ther.* 31 (2008) 187–199. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2885.2008.00944.x>.
- [35] W.H. Colledge, Kisspeptins and GnRH neuronal signalling, *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 20 (2009) 115–121. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2008.10.005>.

- [36] J.P. Bhattarai, J. Roa, A.E. Herbison, S.K. Han, Serotonin acts through 5-HT1 and 5-HT2 receptors to exert biphasic actions on GnRH neuron excitability in the mouse, *Endocrinology*. 155 (2014) 513–524. <https://doi.org/10.1210/en.2013-1692>.
- [37] L. Jennes, W.C. Beckman, W.E. Stumpf, R. Grzanna, Anatomical relationships of serotonergic and noradrenalinergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus, *Exp. Brain Res.* 46 (1982) 331–338. <https://doi.org/10.1007/BF00238628>.
- [38] M. Montagne, A. Calas, Serotonin and endocrinology-The pituitary, in: *Neuronal Serotonin*, NN. Osborne & M. Hamon (Eds), New York, 1988: pp. 271–304.
- [39] C. Kordon, Effects of selective experimental changes in regional hypothalamic monoamine levels on superovulation in the immature rat, *Neuroendocrinology*. 4 (1969) 129–138. <https://doi.org/10.1159/000121746>.
- [40] M.L. Vitale, M.N. Parisi, S.R. Chiochio, J.H. Tramezzani, Serotonin induces gonadotrophin release through stimulation of LH-releasing hormone release from the median eminence, *J. Endocrinol.* 111 (1986) 309–315. <https://doi.org/10.1677/joe.0.1110309>.
- [41] J.A. Moguilevsky, M.R. Faigón, M.C. Rubio, P. Scacchi, B. Szwarcfarb, Sexual differences in the effect of serotonin on LH secretion in rats, *Acta Endocrinol. (Copenh.)*. 109 (1985) 320–325. <https://doi.org/10.1530/acta.0.1090320>.
- [42] J.A. Moguilevsky, M.R. Faigón, P. Scacchi, B. Szwarcfarb, Effect of the serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats, *Neuroendocrinology*. 40 (1985) 135–138. <https://doi.org/10.1159/000124064>.
- [43] 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. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)91634-s](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)91634-s).
- [44] M.L. Vitale, M. de las Nieves Parisi, S.R. Chiochio, J.H. Tramezzani, Serotonin stimulates gonadotrophin release by acting directly on the median eminence, *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam. Organo Asoc. Latinoam. Cienc. Fisiol. Asoc. Latinoam. Farmacol.* 35 (1985) 473–479.
- [45] L. Pinilla, A. Ranchal, R. Aguilar, E. Aguilar, Role of the serotonergic system in the control of gonadotropin secretion in prepubertal male rats, *Eur. J. Endocrinol.* 130 (1994) 617–624. <https://doi.org/10.1530/eje.0.1300617>.
- [46] K.N. Westlund, G.V. Childs, Localization of serotonin fibers in the rat adenohypophysis, *Endocrinology*. 111 (1982) 1761–1763. <https://doi.org/10.1210/endo-111-5-1761>.
- [47] 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. <https://doi.org/10.1210/endo-110-3-754>.
- [48] E.Y. Adashi, Endocrinology of the ovary, *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 9 (1994) 815–827. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138602>.
- [49] X.-D. Zhou, D.-D. Shi, Z.-J. Zhang, Ameliorative effects of Radix rehmanniae extract on the anxiety- and depression-like symptoms in ovariectomized mice: A behavioral and molecular study, *Phytomedicine*. 63 (2019) 153012. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2019.153012>.
- [50] A.N. Hirshfield, Development of follicles in the mammalian ovary, *Int. Rev. Cytol.* 124 (1991) 43–101. [https://doi.org/10.1016/s0074-7696\(08\)61524-7](https://doi.org/10.1016/s0074-7696(08)61524-7).
- [51] A.A. Bremer, W.L. Miller, Chapter 13 - Regulation of Steroidogenesis, in: A. Ulloa-Aguirre, P.M. Conn (Eds.), *Cell. Endocrinol. Health Dis.*, Academic Press, Boston, 2014: pp. 207–227. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-408134-5.00013-5>.
- [52] J.D. Vidal, D. Dixon, Chapter 26 - Ovary, in: A.W. Suttie (Ed.), *Boormans Pathol. Rat Second Ed.*, Academic Press, Boston, 2018: pp. 523–536. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-391448-4.00026-5>.

- [53] K.H. Moley, J.R. Schreiber, Ovarian Follicular Growth, Ovulation and Atresia, in: A.K. Mukhopadhyay, M.K. Raizada (Eds.), *Tissue Renin-Angiotensin Syst. Curr. Concepts Local Regul. Reprod. Endocr. Organs*, Springer US, Boston, MA, 1995: pp. 103–119. https://doi.org/10.1007/978-1-4899-0952-7_7.
- [54] R. Lew, Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure, *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 55 (2019) 2–13. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.05.005>.
- [55] D.O. Norris, K.H. Lopez, Chapter 4 - The Endocrinology of the Mammalian Ovary, in: D.O. Norris, K.H. Lopez (Eds.), *Horm. Reprod. Vertebr.*, Academic Press, London, 2011: pp. 59–72. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374928-4.10004-5>.
- [56] A. Mlynarcikova, M. Fickova, S. Scsukova, Impact of endocrine disruptors on ovarian steroidogenesis, *Endocr. Regul.* 48 (2014) 201–224. https://doi.org/10.4149/endo_2014_04_201.
- [57] W.L. Miller, Steroidogenesis: Unanswered Questions, *Trends Endocrinol. Metab. TEM.* 28 (2017) 771–793. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.09.002>.
- [58] E. Gómez-Chang, F. Larrea, F. Martínez-Montes, Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis, *TIP Rev. Espec. En Cienc. Quím.-Biológicas.* 15 (2012) 24–36.
- [59] M.K. Gupta, S.-Y. Chia, Ovarian Hormones: Structure, Biosynthesis, Function, Mechanism of Action, and Laboratory Diagnosis, in: T. Falcone, W.W. Hurd (Eds.), *Clin. Reprod. Med. Surg. Pract. Guide*, Springer, New York, NY, 2013: pp. 1–30. https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6837-0_1.
- [60] A. Ben-Chetrit, L. Gotlieb, P.Y. Wong, R.F. Casper, Ovarian response to recombinant human follicle-stimulating hormone in luteinizing hormone-depleted women: examination of the two cell, two gonadotropin theory, *Fertil. Steril.* 65 (1996) 711–717.
- [61] N. Manabe, N. Inoue, T. Miyano, K. Sakamaki, M. Sugimoto, H. Miyamoto, CHAPTER 21 - Follicle Selection in Mammalian Ovaries: Regulatory Mechanisms of Granulosa Cell Apoptosis during Follicular Atresia, in: P.C.K. Leung, E.Y. Adashi (Eds.), *Ovary Second Ed.*, Academic Press, San Diego, 2004: pp. 369–385. <https://doi.org/10.1016/B978-012444562-8/50022-7>.
- [62] P. Monget, K. McNatty, D. Monniaux, The Crazy Ovary, *Genes.* 12 (2021) 928. <https://doi.org/10.3390/genes12060928>.
- [63] J.S. Richards, The Ovarian Cycle, *Vitam. Horm.* 107 (2018) 1–25. <https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.009>.
- [64] C. Liu, J. Peng, M.M. Matzuk, H.H.-C. Yao, Lineage specification of ovarian theca cells requires multicellular interactions via oocyte and granulosa cells, *Nat. Commun.* 6 (2015) 6934. <https://doi.org/10.1038/ncomms7934>.
- [65] F. Sánchez, J. Smits, Molecular control of oogenesis, *Biochim. Biophys. Acta.* 1822 (2012) 1896–1912. <https://doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.05.013>.
- [66] M.A. Driancourt, K. Reynaud, R. Cortvrindt, J. Smits, Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function, *Rev. Reprod.* 5 (2000) 143–152. <https://doi.org/10.1530/ror.0.0050143>.
- [67] W. Zheng, G. Nagaraju, Z. Liu, K. Liu, Functional roles of the phosphatidylinositol 3-kinases (PI3Ks) signaling in the mammalian ovary, *Mol. Cell. Endocrinol.* 356 (2012) 24–30. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2011.05.027>.
- [68] E.Y. Adashi, C.E. Resnick, R.G. Rosenfeld, D.R. Powell, R. Koistinen, E.M. Rutanen, M. Seppala, Insulin-like growth factor (IGF) binding protein-1 is an antigonadotropin: evidence that optimal follicle-stimulating hormone action in ovarian granulosa cells is contingent upon amplification by endogenously-derived IGFs, *Adv. Exp. Med. Biol.* 343 (1993) 377–385. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-2988-0_35.
- [69] M. Orisaka, S. Orisaka, J.-Y. Jiang, J. Craig, Y. Wang, F. Kotsuji, B.K. Tsang, Growth differentiation factor 9 is antiapoptotic during follicular development from preantral to early antral stage, *Mol. Endocrinol. Baltim. Md.* 20 (2006) 2456–2468. <https://doi.org/10.1210/me.2005-0357>.
- [70] P.G. Knight, C. Glistler, Local roles of TGF-beta superfamily members in the control of ovarian follicle development, *Anim. Reprod. Sci.* 78 (2003) 165–183. [https://doi.org/10.1016/s0378-4320\(03\)00089-7](https://doi.org/10.1016/s0378-4320(03)00089-7).

- [71] C. Ottolenghi, E. Pelosi, J. Tran, M. Colombino, E. Douglass, T. Nedorezov, A. Cao, A. Forabosco, D. Schlessinger, Loss of Wnt4 and Foxl2 leads to female-to-male sex reversal extending to germ cells, *Hum. Mol. Genet.* 16 (2007) 2795–2804. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddm235>.
- [72] T. Worku, Z.U. Rehman, H.S. Talpur, D. Bhattarai, F. Ullah, N. Malobi, T. Kebede, L. Yang, MicroRNAs: New Insight in Modulating Follicular Atresia: A Review, *Int. J. Mol. Sci.* 18 (2017) E333. <https://doi.org/10.3390/ijms18020333>.
- [73] X. Jin, L.-J. Xiao, X.-S. Zhang, Y.-X. Liu, Apoptosis in ovary, *Front. Biosci. Sch. Ed.* 3 (2011) 680–697. <https://doi.org/10.2741/s180>.
- [74] C.J. Hubbard, B. Oxberry, Follicular Atresia, in: G. Familiari, S. Makabe, P.M. Motta (Eds.), *Ultrastruct. Ovary*, Springer US, Boston, MA, 1991: pp. 273–285. https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3944-5_17.
- [75] M.J. Moran, M.E. Ayala, E. Gallegos, J. Romero, R. Chavira, P. Damián-Matsumura, R. Domínguez, 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. <https://doi.org/10.1071/RD12253>.
- [76] R. Depalo, L. Nappi, G. Loverro, S. Bettocchi, M.L. Caruso, A.M. Valentini, L. Selvaggi, Evidence of apoptosis in human primordial and primary follicles, *Hum. Reprod. Oxf. Engl.* 18 (2003) 2678–2682. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg507>.
- [77] G.H. Vázquez-Nin, M.L. Escobar, O.M. Echeverría, Follicular Atresia in Adult Animals, in: G.H. Vázquez-Nin, M.L. Escobar, M. De Felici, O.M. Echeverría, F.G. Klinger (Eds.), *Cell Death Mamm. Ovary*, Springer Netherlands, Dordrecht, 2011: pp. 203–219. https://doi.org/10.1007/978-94-007-1134-1_13.
- [78] S. Kaczanowski, Apoptosis: its origin, history, maintenance and the medical implications for cancer and aging, *Phys. Biol.* 13 (2016) 031001. <https://doi.org/10.1088/1478-3975/13/3/031001>.
- [79] G. Yan, M. Elbadawi, T. Efferth, Multiple cell death modalities and their key features (Review), *World Acad. Sci. J.* 2 (2020) 39–48. <https://doi.org/10.3892/wasj.2020.40>.
- [80] S.L.P. Regan, P.G. Knight, J.L. Yovich, Y. Leung, F. Arfuso, A. Dharmarajan, Granulosa Cell Apoptosis in the Ovarian Follicle—A Changing View, *Front. Endocrinol.* 9 (2018) 61. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00061>.
- [81] I.L. Van Wezel, A.M. Dharmarajan, T.C. Lavranos, R.J. Rodgers, Evidence for alternative pathways of granulosa cell death in healthy and slightly atretic bovine antral follicles, *Endocrinology.* 140 (1999) 2602–2612. <https://doi.org/10.1210/endo.140.6.6758>.
- [82] R.J. Aitken, J.K. Findlay, K.J. Hutt, J.B. Kerr, Apoptosis in the germ line, *Reprod. Camb. Engl.* 141 (2011) 139–150. <https://doi.org/10.1530/REP-10-0232>.
- [83] E. Asselin, C.W. Xiao, Y.F. Wang, B.K. Tsang, Mammalian follicular development and atresia: role of apoptosis, *Biol. Signals Recept.* 9 (2000) 87–95. <https://doi.org/10.1159/000014627>.
- [84] R. Young, R.A. Glennon, Discriminative stimulus properties of amphetamine and structurally related phenalkylamines, *Med. Res. Rev.* 6 (1986) 99–130. <https://doi.org/10.1002/med.2610060105>.
- [85] J.P. Capela, H. Carmo, F. Remião, M.L. Bastos, A. Meisel, F. Carvalho, Molecular and cellular mechanisms of ecstasy-induced neurotoxicity: an overview, *Mol. Neurobiol.* 39 (2009) 210–271. <https://doi.org/10.1007/s12035-009-8064-1>.
- [86] A.R. Green, A.O. Mehan, J.M. Elliott, E. O’Shea, M.I. Colado, The pharmacology and clinical pharmacology of 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA, “ecstasy”), *Pharmacol. Rev.* 55 (2003) 463–508. <https://doi.org/10.1124/pr.55.3.3>.
- [87] B.K. Yamamoto, A. Moszczynska, G.A. Gudelsky, Amphetamine toxicities: classical and emerging mechanisms, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1187 (2010) 101–121. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2009.05141.x>.
- [88] C.E. Cook, A.R. Jeffcoat, J.M. Hill, D.E. Pugh, P.K. Patetta, B.M. Sadler, W.R. White, M. Perez-Reyes, Pharmacokinetics of methamphetamine self-administered to human subjects by smoking S-(+)-methamphetamine hydrochloride, *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 21 (1993) 717–723.

- [89] I. Kim, J.M. Oyler, E.T. Moolchan, E.J. Cone, M.A. Huestis, Urinary pharmacokinetics of methamphetamine and its metabolite, amphetamine following controlled oral administration to humans, *Ther. Drug Monit.* 26 (2004) 664–672. <https://doi.org/10.1097/00007691-200412000-00013>.
- [90] A.R. Green, E. O'shea, M.I. Colado, A review of the mechanisms involved in the acute MDMA (ecstasy)-induced hyperthermic response, *Eur. J. Pharmacol.* 500 (2004) 3–13. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2004.07.006>.
- [91] E.J. Jaehne, A. Salem, R.J. Irvine, Pharmacological and behavioral determinants of cocaine, methamphetamine, 3,4-methylenedioxymethamphetamine, and para-methoxyamphetamine-induced hyperthermia, *Psychopharmacology (Berl.)*. 194 (2007) 41–52. <https://doi.org/10.1007/s00213-007-0825-9>.
- [92] J.A. Henry, Ecstasy and the dance of death, *BMJ*. 305 (1992) 5–6. <https://doi.org/10.1136/bmj.305.6844.5>.
- [93] H. Kalant, The pharmacology and toxicology of “ecstasy” (MDMA) and related drugs, *CMAJ Can. Med. Assoc. J. J. Assoc. Medicale Can.* 165 (2001) 917–928.
- [94] M. Carvalho, H. Pontes, F. Remião, M.L. Bastos, F. Carvalho, Mechanisms underlying the hepatotoxic effects of ecstasy, *Curr. Pharm. Biotechnol.* 11 (2010) 476–495. <https://doi.org/10.2174/138920110791591535>.
- [95] M. Ninković, V. Selaković, M. Dukić, P. Milosavljević, I. Vasiljević, M. Jovanović, Z. Malicević, Oxidative stress in rat kidneys due to 3,4-methylenedioxymetamphetamine (ecstasy) toxicity, *Nephrol. Carlton Vic.* 13 (2008) 33–37. <https://doi.org/10.1111/j.1440-1797.2007.00886.x>.
- [96] E. Alves, T. Summavielle, C.J. Alves, J.B.A. Custódio, E. Fernandes, M. de Lourdes Bastos, M.A. Tavares, F. Carvalho, Ecstasy-induced oxidative stress to adolescent rat brain mitochondria in vivo: influence of monoamine oxidase type A, *Addict. Biol.* 14 (2009) 185–193. <https://doi.org/10.1111/j.1369-1600.2008.00143.x>.
- [97] K.M. Kahlig, F. Binda, H. Khoshbouei, R.D. Blakely, D.G. McMahon, J.A. Javitch, A. Galli, Amphetamine induces dopamine efflux through a dopamine transporter channel, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 3495–3500. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407737102>.
- [98] S. Ramamoorthy, R.D. Blakely, Phosphorylation and sequestration of serotonin transporters differentially modulated by psychostimulants, *Science*. 285 (1999) 763–766. <https://doi.org/10.1126/science.285.5428.763>.
- [99] M. Ferrucci, F. Limanaqi, L. Ryskalin, F. Biagioni, C.L. Busceti, F. Fornai, The Effects of Amphetamine and Methamphetamine on the Release of Norepinephrine, Dopamine and Acetylcholine From the Brainstem Reticular Formation, *Front. Neuroanat.* 13 (2019). <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fnana.2019.00048> (accessed June 1, 2022).
- [100] H.H. Sitte, M. Freissmuth, The reverse operation of Na(+)/Cl(-)-coupled neurotransmitter transporters--why amphetamines take two to tango, *J. Neurochem.* 112 (2010) 340–355. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.2009.06474.x>.
- [101] U.V. Berger, X.F. Gu, E.C. Azmitia, The substituted amphetamines 3,4-methylenedioxymethamphetamine, methamphetamine, p-chloroamphetamine and fenfluramine induce 5-hydroxytryptamine release via a common mechanism blocked by fluoxetine and cocaine, *Eur. J. Pharmacol.* 215 (1992) 153–160. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(92\)90023-w](https://doi.org/10.1016/0014-2999(92)90023-w).
- [102] J.S. Partilla, A.G. Dempsey, A.S. Nagpal, B.E. Blough, M.H. Baumann, R.B. Rothman, Interaction of amphetamines and related compounds at the vesicular monoamine transporter, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 319 (2006) 237–246. <https://doi.org/10.1124/jpet.106.103622>.
- [103] A.E. Fleckenstein, G.R. Hanson, Impact of psychostimulants on vesicular monoamine transporter function, *Eur. J. Pharmacol.* 479 (2003) 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2003.08.077>.
- [104] T.J. Mantle, K.F. Tipton, N.J. Garrett, Inhibition of monoamine oxidase by amphetamine and related compounds, *Biochem. Pharmacol.* 25 (1976) 2073–2077. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(76\)90432-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(76)90432-9).
- [105] M. Carvalho, H. Carmo, V.M. Costa, J.P. Capela, H. Pontes, F. Remião, F. Carvalho, M. de L. Bastos, Toxicity of amphetamines: an update, *Arch. Toxicol.* 86 (2012) 1167–1231. <https://doi.org/10.1007/s00204-012-0815-5>.

- [106] E. Sanders-Bush, F. Sulser, P-chloroamphetamine: in vivo investigations on the mechanism of action of the selective depletion of cerebral serotonin, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 175 (1970) 419–426.
- [107] C.D. Morgan, F. Cattabeni, E. Costa, Methamphetamine, fenfluramine and their N-dealkylated metabolites: effect on monoamine concentrations in rat tissues, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 180 (1972) 127–135.
- [108] R.W. Fuller, Effects of p-chloroamphetamine on brain serotonin neurons, *Neurochem. Res.* 17 (1992) 449–456. <https://doi.org/10.1007/BF00969891>.
- [109] R.W. Fuller, H.D. Snoddy, B.W. Roush, B.B. Molloy, Further structure-activity studies on the lowering of brain 5-hydroxyindoles by 4-chloramphetamine, *Neuropharmacology.* 12 (1973) 33–42. [https://doi.org/10.1016/0028-3908\(73\)90129-9](https://doi.org/10.1016/0028-3908(73)90129-9).
- [110] E. Sanders-Bush, J.A. Bushing, F. Sulser, p-Chloroamphetamine--inhibition of cerebral tryptophan hydroxylase, *Biochem. Pharmacol.* 21 (1972) 1501–1510. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(72\)90375-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(72)90375-9).
- [111] E. Sanders-Bush, J.A. Bushing, F. Sulser, Long-term effects of p-chloroamphetamine on tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole acetic acid in brain, *Eur. J. Pharmacol.* 20 (1972) 385–388. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(72\)90204-x](https://doi.org/10.1016/0014-2999(72)90204-x).
- [112] E. Sanders-Bush, L.R. Steranka, Immediate and long-term effects of p-chloroamphetamine on brain amines, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 305 (1978) 208–221. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.1978.tb31525.x>.
- [113] D.L. Commins, K.J. Axt, G. Vosmer, L.S. Seiden, Endogenously produced 5,6-dihydroxytryptamine may mediate the neurotoxic effects of para-chloroamphetamine, *Brain Res.* 419 (1987) 253–261. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(87\)90591-9](https://doi.org/10.1016/0006-8993(87)90591-9).
- [114] L.A. Mamounas, M.E. Molliver, Evidence for dual serotonergic projections to neocortex: axons from the dorsal and median raphe nuclei are differentially vulnerable to the neurotoxin p-chloroamphetamine (PCA), *Exp. Neurol.* 102 (1988) 23–36. [https://doi.org/10.1016/0014-4886\(88\)90075-1](https://doi.org/10.1016/0014-4886(88)90075-1).
- [115] L.R. Steranka, E. Sanders-Bush, Long-term effects of continuous exposure to p-chloroamphetamine on central serotonergic mechanisms in mice, *Biochem. Pharmacol.* 27 (1978) 2033–2037. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(78\)90063-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(78)90063-1).
- [116] J. Fain, S.E. Gad, SSRIs (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors), in: P. Wexler (Ed.), *Encycl. Toxicol.* Third Ed., Academic Press, Oxford, 2014: pp. 373–378. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-386454-3.00929-5>.
- [117] S.E. Gad, SSRIs (Selective Serotonin Reuptake Inhibitors), in: P. Wexler (Ed.), *Encycl. Toxicol.* Second Ed., Elsevier, New York, 2005: pp. 79–86. <https://doi.org/10.1016/B0-12-369400-0/00898-X>.
- [118] L. Ezpeleta, G. Keeler, A. Erkanli, E.J. Costello, A. Angold, Epidemiology of psychiatric disability in childhood and adolescence, *J. Child Psychol. Psychiatry.* 42 (2001) 901–914. <https://doi.org/10.1111/1469-7610.00786>.
- [119] G. Akasheh, L. Sirati, A.R. Noshad Kamran, Z. Sepehrmanesh, Comparison of the effect of sertraline with behavioral therapy on semen parameters in men with primary premature ejaculation, *Urology.* 83 (2014) 800–804. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2013.12.004>.
- [120] H.Y. Elnazer, D.S. Baldwin, Treatment with citalopram, but not with agomelatine, adversely affects sperm parameters: a case report and translational review, *Acta Neuropsychiatr.* 26 (2014) 125–129. <https://doi.org/10.1017/neu.2013.60>.
- [121] B.E. Friedman, J.L. Rogers, L.K. Shahine, L.M. Westphal, R.B. Lathi, Effect of selective serotonin reuptake inhibitors on in vitro fertilization outcome, *Fertil. Steril.* 92 (2009) 1312–1314. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.03.060>.
- [122] H. Koyuncu, E.C. Serefoglu, E. Yencilek, H. Atalay, N.B. Akbas, K. Sarica, Escitalopram treatment for premature ejaculation has a negative effect on semen parameters, *Int. J. Impot. Res.* 23 (2011) 257–261. <https://doi.org/10.1038/ijir.2011.35>.
- [123] J.Z. Milosavljević, M.N. Milosavljević, P.S. Arsenijević, M.N. Milentijević, S.M. Stefanović, The effects of selective serotonin reuptake inhibitors on male and female fertility: a brief literature review, *Int. J. Psychiatry Clin. Pract.* 26 (2022) 43–49. <https://doi.org/10.1080/13651501.2021.1872647>.

- [124] C.J. Moore, N.E. DeLong, K.A. Chan, A.C. Holloway, J.J. Petrik, D.M. Sloboda, Perinatal Administration of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Induces Impairments in Reproductive Function and Follicular Dynamics in Female Rat Offspring, *Reprod. Sci.* 22 (2015) 1297–1311. <https://doi.org/10.1177/1933719115578925>.
- [125] M.R. Safarinejad, Evaluation of endocrine profile and hypothalamic-pituitary-testis axis in selective serotonin reuptake inhibitor-induced male sexual dysfunction, *J. Clin. Psychopharmacol.* 28 (2008) 418–423. <https://doi.org/10.1097/JCP.0b013e31817e6f80>.
- [126] C. Tanrikut, P.N. Schlegel, Antidepressant-associated changes in semen parameters, *Urology.* 69 (2007) 185.e5–7. <https://doi.org/10.1016/j.urology.2006.10.034>.
- [127] L. Descarries, M. Riad, Effects of the antidepressant fluoxetine on the subcellular localization of 5-HT_{1A} receptors and SERT, *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 367 (2012) 2416–2425. <https://doi.org/10.1098/rstb.2011.0361>.
- [128] S. Tavoulari, L.R. Forrest, G. Rudnick, Fluoxetine (Prozac) binding to serotonin transporter is modulated by chloride and conformational changes, *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 29 (2009) 9635–9643. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0440-09.2009>.
- [129] L. Lemberger, H. Rowe, R. Carmichael, R. Crabtree, J. Horng, F. Bymaster, D. Wong, Fluoxetine, a Selective Serotonin Uptake Inhibitor, *Clin. Pharmacol. Ther.* 23 (1978) 421–429.
- [130] R.F. Bergstrom, L. Lemberger, N.A. Farid, R.L. Wolen, Clinical pharmacology and pharmacokinetics of fluoxetine: a review, *Br. J. Psychiatry. Suppl.* (1988) 47–50.
- [131] M.T. Pato, D.L. Murphy, C.L. DeVane, Sustained plasma concentrations of fluoxetine and/or norfluoxetine four and eight weeks after fluoxetine discontinuation, *J. Clin. Psychopharmacol.* 11 (1991) 224–225. <https://doi.org/10.1097/00004714-199106000-00024>.
- [132] 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.055>.
- [133] Z. Fisar, J. Hroudová, J. Raboch, Inhibition of monoamine oxidase activity by antidepressants and mood stabilizers, *Neuro Endocrinol. Lett.* 31 (2010) 645–656.
- [134] C. Sánchez, J. Hyttel, Comparison of the effects of antidepressants and their metabolites on reuptake of biogenic amines and on receptor binding, *Cell. Mol. Neurobiol.* 19 (1999) 467–489. <https://doi.org/10.1023/a:1006986824213>.
- [135] G. Paxinos, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition*, 2021. <https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-374121-9> (accessed March 20, 2021).
- [136] T.G. Heffner, J.A. Hartman, L.S. Seiden, A rapid method for the regional dissection of the rat brain, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (1980) 453–456. [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90254-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90254-3).
- [137] M.E. Ayala, J. Monroy, L. Morales, M.E. Castro, R. Domínguez, Effects of a lesion in the dorsal raphe nuclei performed during the juvenile period of the female rat, on puberty, *Brain Res. Bull.* 47 (1998) 211–218. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(98\)00074-4](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(98)00074-4).
- [138] S.L. Lightman, The neuroendocrinology of stress: a never ending story, *J. Neuroendocrinol.* 20 (2008) 880–884. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2826.2008.01711.x>.
- [139] M.C. Boadle-Biber, K.C. Corley, L. Graves, T.H. Phan, J. Rosecrans, Increase in the activity of tryptophan hydroxylase from cortex and midbrain of male Fischer 344 rats in response to acute or repeated sound stress, *Brain Res.* 482 (1989) 306–316. [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(89\)91193-1](https://doi.org/10.1016/0006-8993(89)91193-1).
- [140] F. Chaouloff, Serotonin, stress and corticoids, *J. Psychopharmacol. Oxf. Engl.* 14 (2000) 139–151. <https://doi.org/10.1177/026988110001400203>.
- [141] F. Chaouloff, O. Berton, P. Mormède, Serotonin and stress, *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 21 (1999) 285–325. [https://doi.org/10.1016/S0893-133X\(99\)00008-1](https://doi.org/10.1016/S0893-133X(99)00008-1).

- [142] M.A. Aragón, M.E. Ayala, M. Marín, A. Avilés, P. Damián-Matsumura, R. Domínguez, Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development, *Reprod. Camb. Engl.* 129 (2005) 717–727. <https://doi.org/10.1530/rep.1.00598>.
- [143] F. Martín, F. Artigas, Simultaneous effects of p-chloroamphetamine, d-fenfluramine, and reserpine on free and stored 5-hydroxytryptamine in brain and blood, *J. Neurochem.* 59 (1992) 1138–1144. <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08356.x>.
- [144] G. Rudnick, S.C. Wall, p-Chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters, *Biochemistry.* 31 (1992) 6710–6718. <https://doi.org/10.1021/bi00144a010>.
- [145] X. Zhang, J.-M. Beaulieu, T.D. Sotnikova, R.R. Gainetdinov, M.G. Caron, Tryptophan hydroxylase-2 controls brain serotonin synthesis, *Science.* 305 (2004) 217. <https://doi.org/10.1126/science.1097540>.
- [146] L. Casarini, P. Crépieux, Molecular Mechanisms of Action of FSH, *Front. Endocrinol.* 10 (2019) 305. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00305>.
- [147] I.M. Lacau-Mengido, C. Libertun, D. Becú-Villalobos, Different serotonin receptor types participate in 5-hydroxytryptophan-induced gonadotropins and prolactin release in the female infantile rat, *Neuroendocrinology.* 63 (1996) 415–421. <https://doi.org/10.1159/000127089>.
- [148] D.J. Spergel, Modulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Activity and Secretion in Mice by Non-peptide Neurotransmitters, Gasotransmitters, and Gliotransmitters, *Front. Endocrinol.* 10 (2019) 329. <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00329>.
- [149] K. Endlich, R. Kühn, M. Steinhausen, Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats, *Kidney Int.* 43 (1993) 314–323. <https://doi.org/10.1038/ki.1993.49>.
- [150] M. Verbeke, B. Smöllich, J. van de Voorde, L. de Ridder, N. Lameire, Beneficial influence of ketanserin on autoregulation of blood flow in post-ischemic kidneys, *J. Am. Soc. Nephrol. JASN.* 7 (1996) 621–627. <https://doi.org/10.1681/ASN.V74621>.
- [151] C.-K. Yang, R.S.-C. Wu, C.-H. Wu, T.R.-Y. Lin, H.-D. Tsai, Sleep deprivation enhances peripheral serotonin secretion to regulate the large follicle steroidogenesis of rats, *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 54 (2015) 260–265. <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2014.10.007>.
- [152] J. Bódis, A. Török, H.R. Tinneberg, V. Hanf, M. Hamori, P. Cledon, Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells, *Fertil. Steril.* 57 (1992) 1008–1011. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55017-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55017-1).
- [153] M. Koppan, J. Bodis, Z. Verzar, H.-R. Tinneberg, A. Torok, Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system, *Endocrine.* 24 (2004) 155–159. <https://doi.org/10.1385/ENDO:24:2:155>.
- [154] J.G. Hensler, Chapter 15 - Serotonin, in: S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers, D.L. Price (Eds.), *Basic Neurochem.* Eighth Ed., Academic Press, New York, 2012: pp. 300–322. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00015-8>.
- [155] D.A. Nikishin, N.M. Alyoshina, Y.B. Shmukler, Synthesis and Membrane Transport of Serotonin in the Developing Ovarian Follicle of Mouse, *Dokl. Biochem. Biophys.* 478 (2018) 4–7. <https://doi.org/10.1134/S1607672918010027>.
- [156] A.M. Belcher, S.J. O'Dell, J.F. Marshall, Impaired object recognition memory following methamphetamine, but not p-chloroamphetamine- or d-amphetamine-induced neurotoxicity, *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 30 (2005) 2026–2034. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300771>.
- [157] T. Xie, L. Tong, M.W. McLane, G. Hatzidimitriou, J. Yuan, U. McCann, G. Ricaurte, Loss of serotonin transporter protein after MDMA and other ring-substituted amphetamines, *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll. Neuropsychopharmacol.* 31 (2006) 2639–2651. <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301031>.
- [158] W. Zha, H.T.B. Ho, T. Hu, M.F. Hebert, J. Wang, Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1137. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01291-5>.
- [159] A.-A. Hudon Thibeault, L. Laurent, S. Vo Duy, S. Sauvé, P. Caron, C. Guillemette, J.T. Sanderson, C. Vaillancourt, Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture

- model of the feto-placental unit, *Mol. Cell. Endocrinol.* 442 (2017) 32–39. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.021>.
- [160] A.-A. Hudon Thibeault, Y. López de Los Santos, N. Doucet, J.T. Sanderson, C. Vaillancourt, Serotonin and serotonin reuptake inhibitors alter placental aromatase, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 195 (2019) 105470. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105470>.
- [161] N.W. Jacobsen, C.H. Hansen, C. Nellemann, B. Styrisshave, B. Halling-Sørensen, Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on three sex steroids in two versions of the aromatase enzyme inhibition assay and in the H295R cell assay, *Toxicol. In Vitro.* 29 (2015) 1729–1735. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.07.005>.
- [162] T. Klempan, A.-A. Hudon-Thibeault, T. Oufkir, C. Vaillancourt, J.T. Sanderson, Stimulation of serotonergic 5-HT_{2A} receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human choriocarcinoma cells, *Placenta.* 32 (2011) 651–656. <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.003>.
- [163] G. Schmidt, P. Kannisto, C. Owman, N.O. Sjöberg, Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused in vitro?, *Acta Physiol. Scand.* 132 (1988) 251–256. <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1988.tb08324.x>.
- [164] H.H. Ortega, N.R. Salvetti, F. Rey, C.G. Barbeito, E.J. Gimeno, Alteración del ciclo celular y de la expresión de receptores esteroides en el ovario de bovinos con enfermedad quística ovarica, *An. Acad. Nac. Cienc. Exactas Fis. Nat.* tomo 62 (2010) 46–58.
- [165] M.E. Castro, M.E. Ayala, J. Monroy, R. Chavira, P. Damian-Matsumura, R. Domínguez, Changes in monoaminergic activity in the anterior, medium and posterior hypothalamus, gonadotropins levels and ovarian hormones during puberty of the female rat, *Brain Res. Bull.* 54 (2001) 345–352. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(00\)00421-4](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(00)00421-4).
- [166] P. Lin, R. Rui, Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles, *Mol. Reprod. Dev.* 77 (2010) 670–678. <https://doi.org/10.1002/mrd.21202>.
- [167] F.M. Hughes, W.C. Gorospe, Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia, *Endocrinology.* 129 (1991) 2415–2422. <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2415>.
- [168] S.A. Wandji, J.J. Eppig, J.E. Fortune, FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles, *Theriogenology.* 45 (1996) 817–832. [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00011-8](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00011-8).
- [169] Y.S. Yu, H.S. Sui, Z.B. Han, W. Li, M.J. Luo, J.H. Tan, Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors, *Cell Res.* 14 (2004) 341–346. <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290234>.
- [170] A. Amsterdam, I. Keren-Tal, D. Aharoni, A. Dantes, A. Land-Bracha, E. Rimon, R. Sasson, L. Hirsh, Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary, *Steroids.* 68 (2003) 861–867. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.09.003>.
- [171] S.G. Lee, J.Y. Kim, J.-Y. Chung, Y.-J. Kim, J.-E. Park, S. Oh, Y.-D. Yoon, K.S. Yoo, Y.H. Yoo, J.-M. Kim, Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing 17 β -estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary, *Environ. Health Perspect.* 121 (2013) 663–669. <https://doi.org/10.1289/ehp.1205823>.
- [172] Q. Pang, H. Jin, X. Ke, Z. Man, Y. Wang, Y. Tan, Z. Lu, H. Liu, The Role of Serotonin in Concanavalin A-Induced Liver Injury in Mice, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020 (2020) 7504521. <https://doi.org/10.1155/2020/7504521>.
- [173] F. Soga, N. Katoh, T. Inoue, S. Kishimoto, Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 1947–1955. <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700824>.
- [174] V. Zaldivar, M.L. Magri, S. Zárate, G. Jaita, G. Eijo, D. Radl, J. Ferraris, D. Pisera, A. Seilicovich, Estradiol increases the Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in the anterior pituitary gland, *Neuroendocrinology.* 90 (2009) 292–300. <https://doi.org/10.1159/000235618>.

- [175] I. Kitazumi, Y. Maseki, Y. Nomura, A. Shimanuki, Y. Sugita, M. Tsukahara, Okadaic acid induces DNA fragmentation via caspase-3-dependent and caspase-3-independent pathways in Chinese hamster ovary (CHO)-K1 cells, *FEBS J.* 277 (2010) 404–412. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07493.x>.
- [176] Y. Liang, C. Yan, N.F. Schor, Apoptosis in the absence of caspase 3, *Oncogene.* 20 (2001) 6570–6578. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204815>.
- [177] 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. <https://doi.org/10.1016/j.neuroscience.2010.08.055>.
- [178] R.P. Vertes, S.B. Linley, W.B. Hoover, Pattern of distribution of serotonergic fibers to the thalamus of the rat, *Brain Struct. Funct.* 215 (2010) 1–28. <https://doi.org/10.1007/s00429-010-0249-x>.
- [179] S. Bell, M. Shipman, A. Bystritsky, T. Haifley, Fluoxetine treatment and testosterone levels, *Ann. Clin. Psychiatry Off. J. Am. Acad. Clin. Psychiatr.* 18 (2006) 19–22. <https://doi.org/10.1080/10401230500464612>.
- [180] K. Motlagh, G. Jelodar, H. Nazem, S. Ahmadi, The Effects of Fluoxetine Usage on the Concentration of Testosterone Hormone, *Int. J. Res. Pharm. Biomed. Sci.* 2 (2012) 87–93.
- [181] B.K. Pushkar, R. Sivabalan, Effect of Fluoxetine hydrochloride on the hormonal profile, *Ann. Appl. Bio-Sci.* 2 (2015) A11–A19.
- [182] M.R. de Oliveira, Fluoxetine and the mitochondria: A review of the toxicological aspects, *Toxicol. Lett.* 258 (2016) 185–191. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.07.001>.
- [183] P. Sołek, J. Mytych, A. Tabęcka-Łonczyńska, M. Koziorowski, Molecular Consequences of Depression Treatment: A Potential In Vitro Mechanism for Antidepressants-Induced Reprotoxic Side Effects, *Int. J. Mol. Sci.* 22 (2021) 11855. <https://doi.org/10.3390/ijms222111855>.
- [184] E.C. Azmitia, Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis, *Brain Res. Bull.* 56 (2001) 413–424. [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00614-1](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00614-1).
- [185] J.P. Capela, E. Fernandes, F. Remião, M.L. Bastos, A. Meisel, F. Carvalho, Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons, *Neurotoxicology.* 28 (2007) 868–875. <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.04.005>.
- [186] E.M. Gouveia, C.R. Franci, Involvement of serotonin 5HT1 and 5HT2 receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion, *Brain Res. Bull.* 63 (2004) 243–251. <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.03.002>.
- [187] C.M. Beasley, D.N. Masica, J.H. Potvin, Fluoxetine: a review of receptor and functional effects and their clinical implications, *Psychopharmacology (Berl.).* 107 (1992) 1–10. <https://doi.org/10.1007/BF02244958>.
- [188] J.K. Wamsley, W.F. Byerley, R.T. McCabe, E.J. McConnell, T.M. Dawson, B.I. Grosser, Receptor alterations associated with serotonergic agents: an autoradiographic analysis, *J. Clin. Psychiatry.* 48 Suppl (1987) 19–25.
- [189] S.A. Welner, C. De Montigny, J. Desroches, P. Desjardins, B.E. Suranyi-Cadotte, Autoradiographic quantification of serotonin1A receptors in rat brain following antidepressant drug treatment, *Synap. N. Y. N.* 4 (1989) 347–352. <https://doi.org/10.1002/syn.890040410>.
- [190] E.C. Hwang, M.H. Van Woert, Acute versus chronic effects of serotonin uptake blockers on potentiation of the “serotonin syndrome,” *Commun. Psychopharmacol.* 4 (1980) 161–167.
- [191] D.D. Savage, F. A, M. J, Differential effects of monoamine oxidase inhibitors and serotonin reuptake inhibitors on 3H-serotonin receptor binding in rat brain, *Eur. J. Pharmacol.* 58 (1979). [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(79\)90344-3](https://doi.org/10.1016/0014-2999(79)90344-3).
- [192] D.D. Savage, J. Mendels, A. Frazer, Monoamine oxidase inhibitors and serotonin uptake inhibitors: differential effects on [3H]serotonin binding sites in rat brain, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 212 (1980) 259–263.
- [193] F. Xu, G. Zhang, J. Yin, Q. Zhang, M.-Y. Ge, L. Peng, S. Wang, Y. Li, Fluoxetine mitigating late-stage cognition and neurobehavior impairment induced by cerebral ischemia reperfusion injury through inhibiting ERS-mediated neurons apoptosis in the hippocampus, *Behav. Brain Res.* 370 (2019) 111952. <https://doi.org/10.1016/j.bbr.2019.111952>.

IX. APÉNDICES



**LXII CONGRESO NACIONAL
DE LA SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C.**



UNIVERSIDAD
AUTÓNOMA DE
QUERÉTARO

QUERÉTARO 2019 DEL 11 AL 15
DE AGOSTO





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/
MESA DIRECTIVA:**

DR. BENJAMÍN FLORÁN GARDUÑO
Presidente

DR. DANIEL ORTUÑO SAHAGÚN
Vicepresidente

DRA. MA. DEL CARMEN CORTÉS SÁNCHEZ
Secretaria

DRA. CONSUELO MORGADO-VALLE
Tesorera

SEDES:

Universidad Autónoma de Querétaro
Centro de las Campanas,
Centro Universitario
76010 Santiago de Querétaro, Qro.

Hotel Fiesta Inn
Querétaro
Av. 5 de Febrero No. 108
Cap. Niños Héroes
76010 Querétaro, Qro.

Informes e inscripciones:
www.smcf.org.mx

Dudas y aclaraciones:
smcf.congreso@gmail.com

Fecha límite para la recepción de trabajos:
Con cuota de descuento: al 30 de abril de 2019
Con cuota extemporánea: del 1º al 15 de mayo de 2019



**CLu-58****Fluoxetina y expresión del receptor a serotonina 5-HT7 en el ovario de la rata prepúber**

Gallegos Pacheco Eloir (Estudiante posgrado)¹, Monroy Moreno Juana¹, Ayala Escobar María Elena¹, Rivas Arzaluz Cindy², Chavarría Torres Camila², Aragón Martínez Andrés²

¹Laboratorio de Pubertad,UIBR, FES-Zaragoza, UNAM. ²Laboratorio de Gametos y Desarrollo Tecnológico, FES-Iztacala, UNAM

La *fluoxetina* (FLX), inhibidor selectivo de la recaptura de serotonina (ISRS) incrementa la transmisión serotoninérgica en el sistema nervioso central y se prescribe en el tratamiento de la depresión en niños. En el folículo ovárico induce la fragmentación del ovocito y la presencia de múltiples ovocitos. Sin embargo, se desconoce si estos efectos resultan de la interacción de la serotonina con su receptor 5-HT7 (R5-HT7). En otros tipos celulares, al R5-HT7 se le asocia con la regulación del crecimiento y mantenimiento de la estructura celular. Por ello, en este estudio se decidió identificar el R5-HT7 en los componentes del ovario de la rata prepúber y se evaluó el efecto de la FLX en la expresión del R5-HT7.

A ratas hembras de la cepa CII-ZV de 30 días de edad se les administró por vía intraperitoneal 5 o 10 mg/Kg de p.c. de FLX, como grupo de comparación se utilizaron ratas tratadas con solución salina (SS). Los animales se terminaron a las 48 o 120 horas después del tratamiento. En el ovario se identificó por inmunohistoquímica la presencia del R5-HT7 y se evaluó la proteína del receptor por Western Blot.

El R5-HT7 se identifica en los ovocitos de los folículos en diferentes etapas de desarrollo. La expresión de la proteína del R5-HT7 no se modificó en los animales que se inyectaron con la dosis de 5 mg de FLX y aumentó en los tratados con 10 mg/Kg, lo cual fue significativo únicamente en los animales terminados a las 120h (SS48h: 73.67±9.02 vs. FLX48h: 91.33±5.48, ns; SS120h:41.33±8.10 vs. FLX120h: 76.67±8.58, p<0.05).

Los resultados de este estudio muestran que en el ovario de la rata prepúber se expresa el R5-HT7 y que el incremento en la actividad serotoninérgica inducida por la administración de FLX favorece su expresión.

Investigación realizada gracias al programa UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN226017



Contents lists available at ScienceDirect

Reproductive Toxicology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/reprotox

p-Chloroamphetamine decreases serotonin and induces apoptosis in granulosa cells and follicular atresia in prepubertal female rats

Eloir Gallegos^a, Marisol Ascona^a, Juana Monroy^a, Marta Elena Castro-Manreza^b,
Andrés Aragón-Martínez^c, María Elena Ayala^{a,*}

^a Laboratorio de Pubertad, Unidad Multidisciplinaria de Investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 9-020, C.P. 15000 Ciudad de México, Mexico

^b Laboratorio de Inmunología y Células Madre, Unidad Multidisciplinaria de Investigación, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, AP 9-020, C.P. 15000 Ciudad de México, Mexico

^c Laboratorio de Gametos y Desarrollo Tecnológico, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Los Reyes Iztacala, Tlalnepantla, C.P. 09230 Estado de México, Mexico

ARTICLE INFO

Handling Editor: Anna Price

Keywords:

Ovary
Follicular development
Apoptosis
Serotonin
P-Chloroamphetamine
Estradiol

ABSTRACT

Amphetamine derivatives negatively impact serotonin (5-HT) production, which triggers apoptosis in different tissues, depending on the receptor they bind. 5-HT in the ovary stimulates estradiol secretion, a survival factor of granulosa cells. The effect of amphetamine derivatives on the serotonergic system of the ovary and follicular development is unknown. Therefore, in this study, we investigated the effects of p-chloroamphetamine (pCA), derived from amphetamines, on estradiol production, follicular development, apoptosis of granulosa cells, and serotonin 5-HT₇ receptor (R5-HT₇) expression. Female rats (30 days old) were injected with 10 mg/kg of pCA intraperitoneally and were euthanized 48 or 120 h after treatment. The concentration of 5-HT in the hypothalamus decreased at 48 and 120 h after treatment and in the ovary at 120 h. The serum concentration of estradiol decreased at all times studied. Follicular atresia, TUNEL-positive (apoptotic) granulosa cells and Bax expression were elevated by pCA, but none of these effects was associated with R5-HT₇ expression. These results suggest that pCA induces the dysregulation of the serotonergic system in the hypothalamus and the ovary, negatively impacting estradiol production and follicular development.

1. Introduction

The main consumers of amphetamine derivatives, such as 3,4-methylenedioxymethamphetamine (MDMA or ecstasy), are young people who begin using these derivatives between 12 and 17 years of age. These substances can potentially affect reproduction and fertility in adulthood. Amphetamine derivatives such as p-chloroamphetamine (pCA) and MDMA act on the central nervous system (CNS) and inhibit the activity of the serotonergic system [1,2]. They negatively impact the reproductive physiology of males, diminish spermatogenesis and testosterone secretion and impair copulatory activity [3–5]. No information is available regarding females. 5-HT acts on the hypothalamic-pituitary-ovary axis [6–9] and modulates the secretion of gonadotropin-releasing hormone (GnRH), gonadotropins [follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)] and estrogens [10]. These hormones regulate ovarian function, steroid hormone

secretion, follicular growth and ovulation [7–9,11].

Follicles, formed by an oocyte surrounded by granulosa and theca cells [12], support the growth of oocytes that can be ovulated and fertilized and synthesize hormones [13]. In the follicle, FSH and LH stimulate the synthesis of estrogens and androgens, respectively [14]. Estrogens and gonadotropins stimulate the proliferation of granulosa cells and follicular development [12,15,16]. Deficiency in the production of gonadotropins and estradiol leads to follicular atresia that occurs at all stages of development [14]. Follicular atresia occurs as a consequence of apoptosis in granulosa cells and oocytes, or both [17–19].

Apoptosis or programmed cell death is initiated either following the activation of extrinsic pathways mediated by death receptors or intrinsic pathways mediated by mitochondria. This last pathway involves the Bcl-2 protein family, including the pro-apoptotic member Bax. In turn, Bax mediates mitochondrial membrane permeabilization and causes the release of cytochrome c to the cytosol, where it binds to Apaf-1 and

* Corresponding author.

E-mail address: elena.ayala@zaragoza.unam.mx (M.E. Ayala).

<https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.04.006>

Received 23 December 2021; Received in revised form 23 March 2022; Accepted 18 April 2022

Available online 20 April 2022

0890-6238/© 2022 Published by Elsevier Inc.

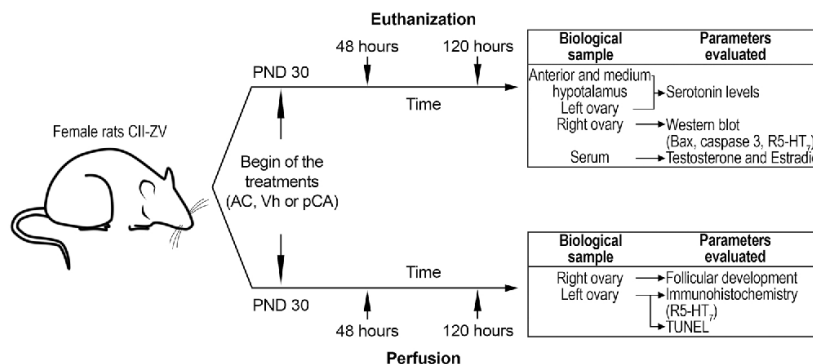


Fig. 1. Diagram of the experimental design. Absolute control (AC), Vehicle (Vh), p-chloroamphetamine (pCA), Postnatal day (PND).

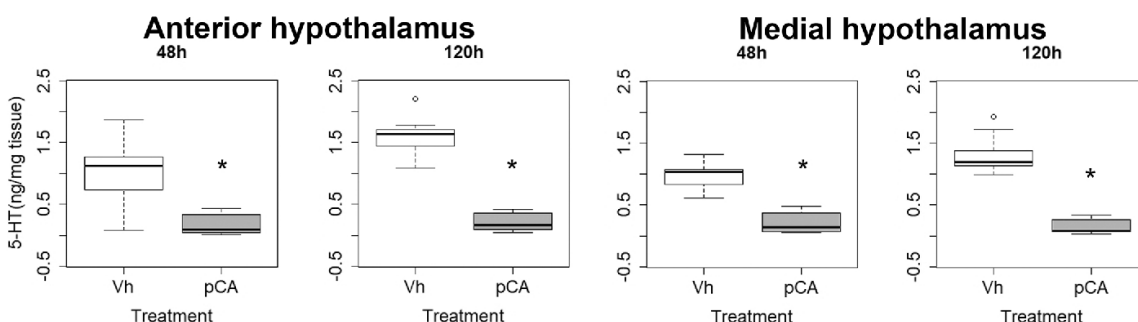


Fig. 2. pCA induced a reduction in the concentrations of 5-HT (ng/mg of tissue) in the anterior and medial hypothalamus. The boxplots show the median and the 1 and 3rd quartiles. The rats in the vehicle control group (Vh) received 0.9% NaCl, and the p-chloroamphetamine (pCA) group received 10 mg/kg pCA dissolved in saline; both treatments were administered via the intraperitoneal route. The rats were injected at 30 days of age and euthanized 48 or 120 h after treatment. *p < 0.0001.

induces the formation of the apoptosome protein complex. Both pathways activate signaling pathways in which proteolytic enzymes, caspases, are key molecules. Caspase-3 plays an essential role in the execution of apoptosis and is a protease effector that leads to the internucleosomal fragmentation of deoxyribonucleic acid (DNA) and morphological changes and cell death [17,20,21].

In the ovary, the pro-apoptotic proteins caspase-3 and Bax have been related to apoptosis in granulosa cells [18,19]. For example: 1) in the mouse ovary, active caspase 3 was identified both in the oocyte and in the granulosa cells of the atretic follicles [18]; 2) in the ovary of adult rats, the pro-apoptotic protein Bax and active caspase-3 were higher in atretic follicles [19]. This finding suggests that caspase-3 plays a role in apoptosis during follicular atresia.

Estrogens regulate the proliferation of granulosa cells and increase the follicle response to the action of gonadotropins [15,16]. In hypophysectomized rats with estrogen diethylstilbestrol implants, apoptosis in granulosa cells was increased [22]. In aromatase-knockout mice [23] or in prepubertal rats with induced ovulation and estrogen receptor blockade [24], increased Bax, apoptosis in granulosa cells and follicular atresia, and decreased the estradiol concentration were observed. This evidence supports that estrogens and gonadotropins are survival factors in granulosa cells [15,16].

In addition to estradiol, intraovarian 5-HT may also play a role in regulating follicular development. 5-HT and its receptors 5-HT₁, 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} and 5-HT₇ have been identified in the preovulatory follicle of the mouse [25,26]. This evidence supports the role of 5-HT as a local regulator in the modulation of ovary functions because it stimulates the secretion of estradiol [10,27].

It is also possible that 5-HT modulates the development of the ovarian follicle. 5-HT binding to its R5-HT₇ regulates meiosis of oocytes and possibly some aspects of ovarian follicle development in *Xenopus laevis* and mice [25,28]. However, the latter aspect has not been studied. Previously, we reported that when prepubertal rats are injected with 5-HT or fluoxetine into the ovarian bursa or intraperitoneally, the concentration of estradiol decreases, and the number of atretic follicles increases [9,29]. Additionally, 5-HT is associated with proliferation, migration, maturation and apoptosis in different cell types [8,30–32] depending on the receptor to which it binds.

5-HT acts as a local regulator of ovarian functions. This study aimed to test the hypothesis that substances that modify the serotonergic system, such as amphetamine derivatives, could affect ovarian function, compromising estradiol production and inducing apoptosis in granulosa cells and follicular atresia in the ovaries of prepubertal female rats. For this purpose, we analyzed the effect of the administration of an amphetamine derivative that inhibits the synthesis of 5-HT, p-chloroamphetamine, on testosterone and estradiol production, follicular development and atresia, granulosa cell apoptosis and proapoptotic Bax protein and R5-HT₇ expression.

2. Materials and methods

2.1. Ethics statement of ethics

All experiments were performed following the guidelines established by the Technical Specifications for the production, care and use of laboratory animals. The Bioethics Committee of the Facultad de Estudios

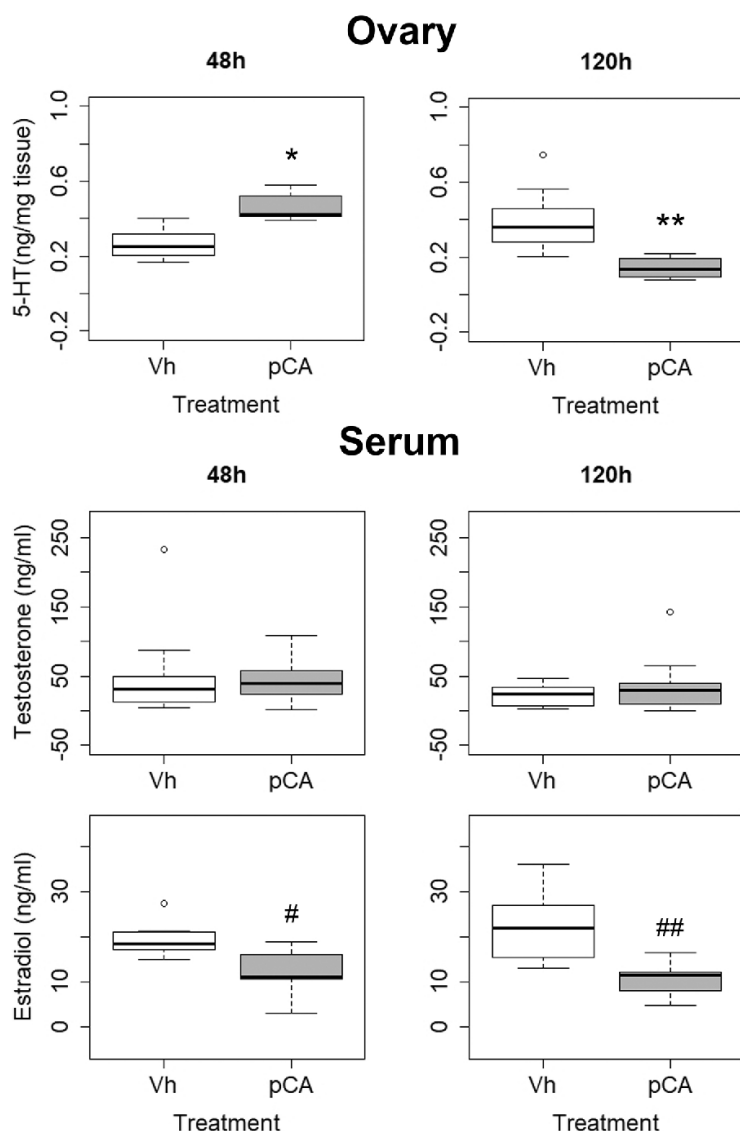


Fig. 3. pCA treatment induced a differential effect on the concentrations of 5-HT (ng/mg of tissue) in the ovary as a function of time but diminished the circulating concentrations of estradiol. The boxplots show the median and the 1 and 3^o quartiles. The rats in the vehicle control group (Vh) received 0.9% NaCl, and the p-chloroamphetamine (pCA) group received 10 mg/kg pCA dissolved in saline; both treatments were administered via the intraperitoneal route. The rats were injected at 30 days of age and euthanized 48 or 120 h after treatment. *p < 0.0001 * *p 0.0006 #p 0.0026 ##p 0.0002.

Superiores, Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México, approved the experimental protocols (FESZ/DEPI/CE/001/21).

2.2. Experimental design

Thirty-day-old female rats of the CII-ZV strain from our breeding stock were maintained under controlled light conditions (lights on from 05:00–19:00 h), with a controlled temperature of 21 °C, humidity between 37% and 40%, and free access to food (Teklad, 2018S, 18% protein rodent diet, Envigo, RMS, Inc., USA) and tap water.

The first part of the work was intended to investigate the effects on concentrations of 5-HT, testosterone and estradiol; expression of the apoptotic proteins BAX, active caspase 3 and R5-HT₇ after one injection of p-chloroamphetamine (Sigma-Aldrich). Groups of ten rats were randomly allocated to each of the experimental groups: 1) the absolute

control (AC) were rats untouched, 2) the vehicle group (Vh) received one intraperitoneal injection of saline solution (0.9% NaCl), and the pCA group received one injection of pCA dissolved in saline (10 mg/kg body weight). Ten rats from each experimental group were euthanized after 48 or 120 h (Fig. 1). In this study, 10 mg/kg pCA was used because it is the effective dose that decreases the synthesis of 5-HT in the CNS 48 h after its administration [4,33],

The second part of the work was intended to investigate the effects of pCA on the ovary, follicular development and atresia. The following parameters were evaluated: follicular population, immunodetection of the R5-HT₇ and terminal deoxynucleotidyl transferase end labeling (TUNEL) in granulosa cells. Three rats from each experimental group were euthanized after 48 or 120 h.

Rats of different experimental groups (n = 10 rats/per group) were euthanized by carbon dioxide inhalation, followed by bleeding between

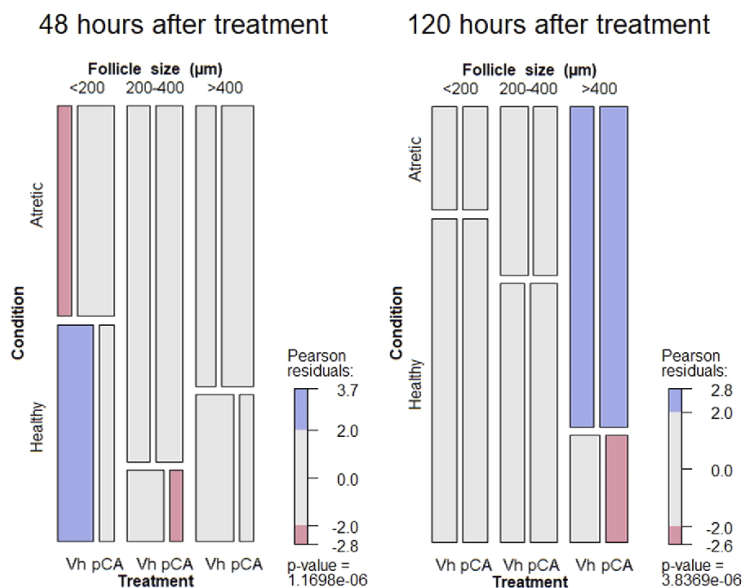


Fig. 4. Effects of pCA on the proportion of follicles. Mosaic plot for the proportion of healthy or atretic follicles. Each tile of the mosaic plot represents the proportion of follicles by condition and size in each treatment. The width of each tile is still proportional to the marginal frequency n_{1j} in each column of the table, but the height is proportional to the conditional frequency $n_{i/j}$ for a given column (condition, healthy or atretic), so the area is proportional to the cell frequency, and complete independence is shown when all tiles in a row have the same height [75]. Tiles with positive, negative, or no deviation from independence are filled with blue, red, or gray colors, respectively (see the look-up table on the right side of the mosaic).

10:00 and 11:00 h. The ovaries and brain were removed and placed in a cold saline solution at autopsy. After removal from the brain, the anterior and medium hypothalamus were sectioned following the parameters of the stereotaxic atlas of Paxinos [34]. The ovaries and anterior and medium hypothalamus were stored individually at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until processing. In the right ovary ($n = 5$ from each group), the caspase 3 and Bax proteins were analyzed by Western blot. In the left ovary ($n = 10$ from each group), 5-HT, was quantified using high-pressure liquid chromatography (HPLC). Blood from the trunk was collected, held at room temperature for 20 min and centrifuged at $1744 \times g$ for 15 min. The serum was stored at $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ until the testosterone and estradiol concentrations were measured.

2.3. Perfusion

Other rats of different experimental groups ($n = 3$ rats/per group) were anesthetized with sodium pentobarbital and perfused through the left ventricle with physiological saline followed by 150 mL of 4% paraformaldehyde in sodium phosphate buffer, pH 7.4, maintaining a perfusion flow rate of 8 mL/min.

Once the perfusion was complete, the ovaries were removed and dissected. Both ovaries were postfixed by immersion in 4% paraformaldehyde for 24 h at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, followed by immersion in 15% sucrose in phosphate-buffered saline (PBS) for 48 h followed by immersion in 70% ethanol. Subsequently, the ovaries were dehydrated in increasing ethanol concentrations and then embedded in Paraplast® (Leica Biosystems, IL, USA). For the left ovary, serial sections ($7\text{-}\mu\text{m}$ thick) were cut using a sliding microtome (AO American optical, mod 820, USA) and mounted on slides coated with poly-L-lysine (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). The sections were immunohistochemically processed for the detection of caspase 3 and Bax proteins and apoptotic cells by TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated DUTP nick end labeling) staining.

2.4. Measurement of 5-HT

After careful sectioning of the nerves and optic chiasma, the brain was removed, placed in a cold saline solution, frozen in liquid nitrogen and then placed on a cold metal plate with the dorsal side facing up. The

anterior and medial hypothalamic regions were dissected following the landmarks described in the stereotaxic atlas for rat [34] and a modification of the procedure reported previously by Heffner [35]. Using a set of three razor blades mounted in a customized cast aluminum cutting block, a pair of coronal slices were obtained from the brain. The first dissected slice was the anterior hypothalamus (*Bregma 1.3 to bregma 2.3*), which included the anterior and median preoptic areas, the supra-chiasmatic nucleus, the paraventricular nucleus, the periventricular nucleus, and the stria terminalis preoptic area. The second slice dissected, the medial hypothalamus (*Bregma 2.3 to bregma 3.3*), which included the median eminence and arcuate nucleus. Both hypothalamic regions and the left ovary were stored at $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ until analysis.

The concentration of 5-HT was measured by HPLC as described previously by Ayala [36]. Briefly, the hypothalamic and ovary samples ($n = 10$ rats/per group) were weighed using a precision balance, homogenized in 300 mL of 0.1 M perchloric acid and centrifuged at $13467 \times g$ for 30 min at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. The supernatant was filtered using 0.2 mm regenerated cellulose filters, and 20 mL of each extract was injected into a chromatography column via a Rheodyne valve. Calibrations were performed by constructing a standard curve over the range 0.1–1 ng/mL for 5-HT, which was identified by the relative retention time compared with the standard. The results are expressed as the amount of neurotransmitter per weight of tissue (ng/mg).

2.5. Quantification of sex steroid hormones

The serum concentrations ($n = 10$ rats/per group) of testosterone and 17β -estradiol were measured by immunoassays using Coat-A-Count kits (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). The progesterone concentration is expressed in ng/mL, and the concentrations of testosterone and 17β -estradiol are expressed in pg/mL. The intraassay and interassay coefficients of variation were 3.9% and 7.6%, respectively, for testosterone and 4.9% and 8.01%, respectively, for 17β -estradiol.

2.6. Follicular development

Three right ovaries from rats from different experimental groups were evaluated. Micrographs of the ovaries were taken at a magnification of 20X with a phone (Redmi Note 8) coupled to a custom 3D-printed

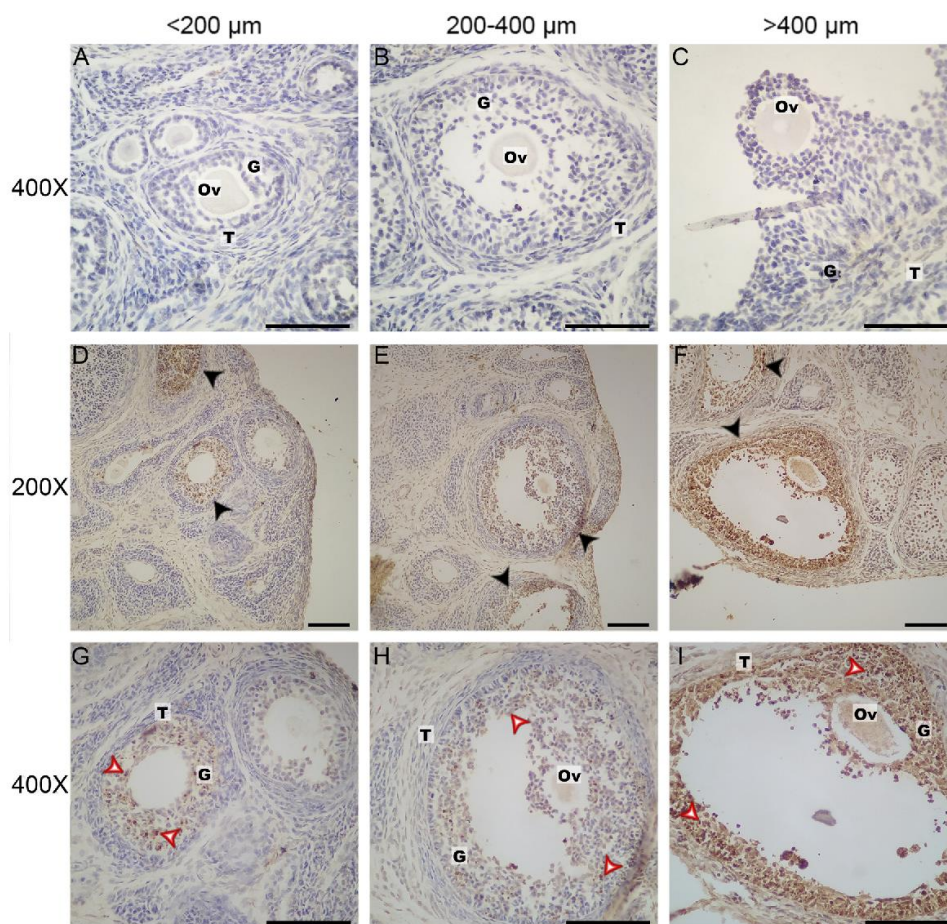


Fig. 5. Photomicrographs of histological sections of ovaries (TUNEL staining) (D-I). The sections show ovarian follicles during different stages of development with TUNEL-positive cells (black arrowhead) and TUNEL-positive granulosa cells, indicating apoptosis (red arrowhead). (A-C) Representative sections of the negative control. The sections were observed at different magnifications (20X and 40X). Ov oocyte, G granulosa, T Theca. Scale bar 100 μm.

microscope adaptor. The images of the ovaries were transferred to an ACER ASPIRE V5-171 computer with Windows 10 Home, calibrated with the image of a micro ruler taken using the same settings; the follicular diameter was measured (ImageJ software version 1.53b, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA) for all follicles present in the sections [37]. The mean follicle diameter was calculated from 2 perpendicular diameters. Based on the diameter, the follicles were classified into three categories: small (< 200 μm), medium (200–400 μm), and large or preovulatory (> 400 μm). The follicles were also classified as healthy or atretic. Degenerative changes detectable by optical microscopy were used as atresia criteria: the presence of more than eight pyknotic nuclei in granulosa cells per follicle, hypertrophy of the theca interna and signs of degeneration in the oocyte [9,38].

2.7. TUNEL analysis

The left ovary (n = 3 per group) was dehydrated and embedded in Paraplast® (Leica Biosystems, IL, USA). Serial sections of a thickness of 7 μm were taken every 100 μm. DNA end labeling was performed with the aid of an apoptosis kit according to the manufacturer’s instructions (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA); briefly, sections were mounted on slides coated with poly-L-lysine, deparaffinized, hydrated

and treated with 20 mg/mL proteinase K (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA) for 30 min at 37 °C in a humidifier chamber. The endogenous peroxidase was blocked for 20 min with block solution (Roche Diagnostics, Indianapolis, IN, USA). The tissue was treated with permeabilization solution with Triton (0.1% Triton in 0.1% sodium citrate) for 2 min. Tissue sections were treated with label solution (terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme and biotinylated 16-dUTP) for 60 min. After each step, the tissue was rinsed twice for 5 min each time. It was then incubated with converter-POD (anti-fluorescein conjugated with horseradish peroxidase) 30 min at 37.8 °C and counterstained with Mayer-hematoxylin, dehydrated and mounted for light microscopy. In the negative control slides, either the TdT enzyme or biotinylated 16-dUTP was omitted in labeling the reaction.

TUNEL-stained sections were observed using an Optiphot-2 microscope (Nikon Instruments, Melville, New York) with a total magnification of 400X. Micrographs were taken with a phone (Redmi Note 8) as described above. All sections of follicles were analyzed to detect the presence of TUNEL-positive follicular cells. The results are presented as label intensity based on the number of TUNEL-positive granulosa cells per follicle. The follicles were classified into two categories: i) moderately labeled, i.e., 1–10 TUNEL-positive granulosa cells, and ii) intensely labeled, i.e., more than 10 TUNEL-positive granulosa cells.

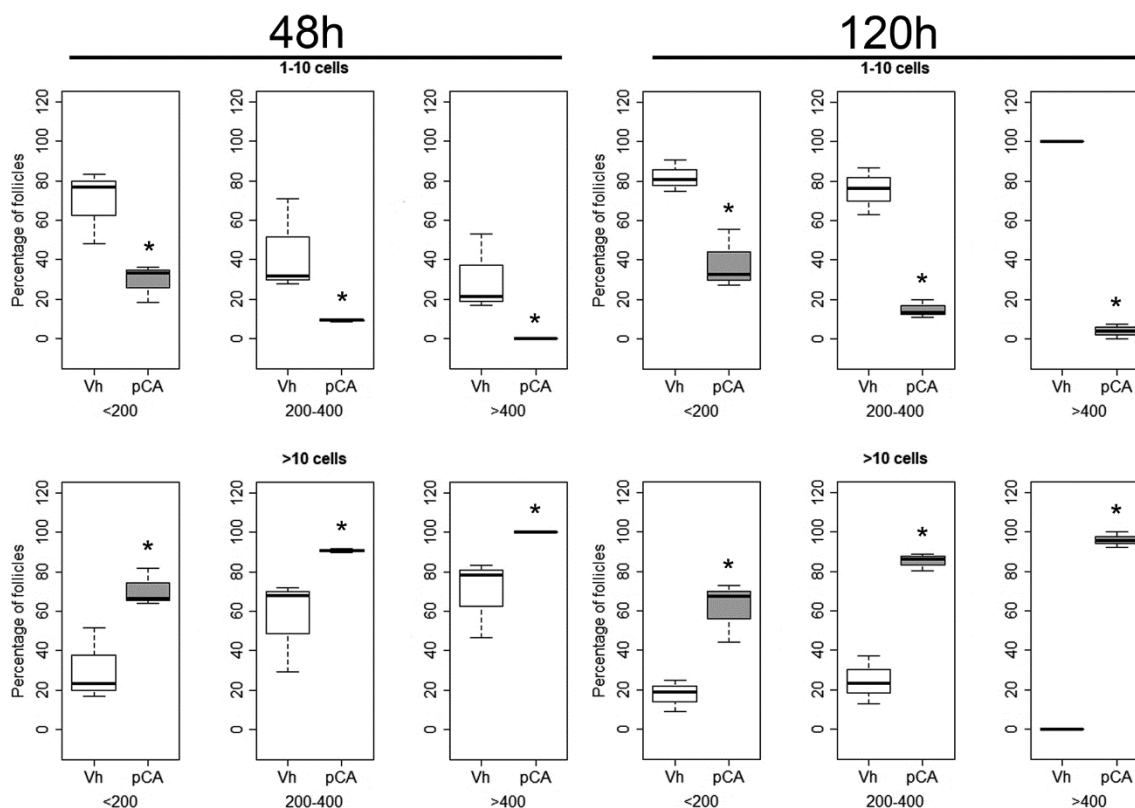


Fig. 6. Effects of pCA treatment in the follicles with TUNEL-positive granulosa cells (moderately labeled, 1–10 TUNEL-positive granulosa cells; intensely labeled, >10 TUNEL-positive granulosa cells) at different stages of development (small: < 200 μm; medium: 200–400 μm; preovulatory: > 400 μm). The rats in the vehicle control group received 0.9% NaCl, and the pCA group received 10 mg/kg pCA dissolved in saline; both treatments were administered via the intraperitoneal route. The rats were injected at 30 days of age and perfused 48 or 120 h after treatment. *p < 0.0001.

2.8. Immunohistochemistry for R5-HT₇

Nine ovary sections per animal (n = 3 per group) were used to detect the R5-HT₇. Ovarian sections were mounted on slides coated with poly-L-lysine, deparaffinized in xylene, and rehydrated through different gradations of ethanol; endogenous peroxidases were blocked with 3% H₂O₂, and nonspecific antibody binding was blocked with 10% bovine serum albumin. The sections were incubated with 40 μl of R5-HT₇ rabbit polyclonal antibody (Dilution: 1: 100, Abcam 128892, Cambridge, United Kingdom), covered with parafilm and incubated overnight in a humid chamber at 4 °C. After each step, the sections were washed with PBS for 5 min. The sections were then incubated with a biotinylated anti-rabbit IgG secondary antibody conjugated to horseradish peroxidase (Vectastain ABC Elite kit; Vector, Inc. Burlingame, CA, USA) for 45 min. Immunoreactivity was detected with a horseradish peroxidase avidin-biotin complex (DAB) (Vector, Inc. Burlingame, CA, USA), counterstained with hematoxylin and mounted with Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ). As a negative control, a section was performed following the same steps described above, but the R5-HT₇ antibody was omitted. R5-HT₇ expression was identified in the different compartments of the follicle (theca cells, granulosa cells and oocyte) using an optical microscope (Nikon, CA, USA).

2.9. Western blot

Protein was extracted from ovary tissue (n = 5 per group) using

200 μl RIPA lysis buffer (Sigma–Aldrich, MO, USA) and protease inhibitor mixture (P8340; Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA). Protein concentrations were determined using a Pierce™ BCA Assay Kit (23227, Thermo Fisher Scientific, Massachusetts USA). A total of 20 μg of total protein per sample in Laemmli buffer was loaded for electrophoresis into 4–20% polyacrylamide gels (MP TGX BIO-RAD, Hercules, CA). The proteins were electrophoretically transferred onto nitrocellulose membranes. The membranes were incubated with a solution containing the corresponding primary antibodies: β-actin (ab-8226, 1:1000) (mouse monoclonal, Abcam, Cambridge) and BAX (ab-104156, 1:1000), or Cas3 (ab-216486, 1:1000), or R5-HT₇ (ab-128892, 1:1000) (rabbit polyclonal, Abcam, Cambridge, UK), followed by detection with horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit IgG (ab-270144, 1:1000) and anti-mouse IgG (ab-19195, 1:1000). Immunoreactive bands were detected by chemiluminescence using the WesternSure PREMIUM Chemiluminescent Substrate (LI-COR Biosciences, USA) with a Cdigit® Blot Scanner (LI-COR Biosciences, USA). The density of the immunoreactive bands was analyzed using Image Studio Digits®, V4.0.21, for Windows. β-actin was used for normalization purposes.

2.10. Statistical analysis

All data were analyzed using GraphPad Prism software. 5-HT, the serum hormone concentrations and expression of R5-HT₇, Caspase-3 and BAX proteins were analyzed using Student’s t test. The number of total follicles was analyzed using the Mann–Whitney U test. The percentage of

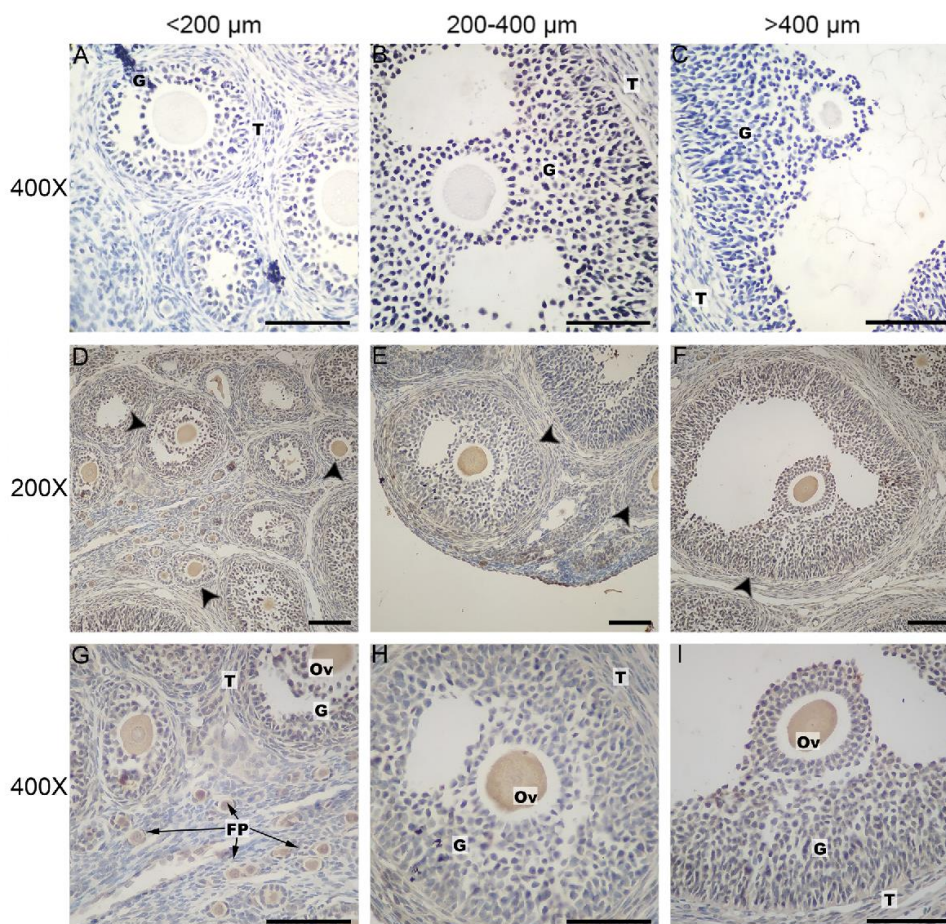


Fig. 7. Photomicrographs of histological sections stained by immunohistochemistry for the R5-HT₇ (D-I) in the ovaries of prepubertal rats. Positive staining is shown as brown color. The sections were observed at different magnifications (20X and 40X). The arrowheads indicate some follicles that express the R5-HT₇. (A-C) Representative sections of the negative control for nonspecific binding of the secondary antibody. Ov oocyte, G granulosa, T theca, PF primordial follicles. Scale bar 100 μm.

TUNEL-positive cells was compared with controls using the chi-square test. All values are expressed as the means ± S.E.M. A probability of less than 5% was considered significant.

3. Results

Compared with the animals in the control group, the 5-HT concentrations in the anterior (1.19 ± 0.04 vs. 1.61 ± 0.09 ; $p = 0.0005$) and medial hypothalamus (1.00 ± 0.10 vs. 1.30 ± 0.10 ; $p = 0.0445$) of the animals treated with the vehicle were higher at 120 h after treatment. No differences were observed in the concentrations of testosterone and estradiol or in the expression of the Bax, caspase-3 and R5-HT₇ proteins (Supplementary Table 1).

Because the 5-HT concentrations in the hypothalamus and ovary of animals injected with vehicle changed, the results observed in the animals injected with p-chloroamphetamine were compared with the results of their respective vehicle-treated groups.

3.1. 5-HT in the hypothalamus and ovary

Compared with the animals of the vehicle group, in the animals

injected with pCA, the 5-HT concentrations in the anterior and medial hypothalamus decreased at 48 and 120 h after treatment ($p < 0.0001$) (Fig. 2). In the ovaries of animals treated with pCA, the concentration of 5-HT was higher at 48 h after treatment ($p < 0.0001$) and decreased at 120 h ($p < 0.0001$) (Fig. 3A).

3.2. Testosterone and estradiol serum concentrations

The testosterone serum concentration in the animals treated with pCA was not modified in comparison with the respective vehicle group (48 h $p = 0.7581$; 120 h $p = 0.2409$) (Fig. 3B). The estradiol serum concentration in the animals treated with pCA decreased at 48 and 120 h after treatment (48 h $p = 0.0026$; 120 h $p = 0.0002$) (Fig. 3C).

3.3. Follicular development

Compared with the animals of the vehicle group, in the ovaries of the rats injected with pCA, the percentage of small, medium and preovulatory atretic follicles increased at 48 h or 120 h after treatment (Fig. 4).

In healthy follicles, the number of TUNEL-positive (apoptotic) cells was negligible. In the ovaries of the animals injected with pCA, atretic

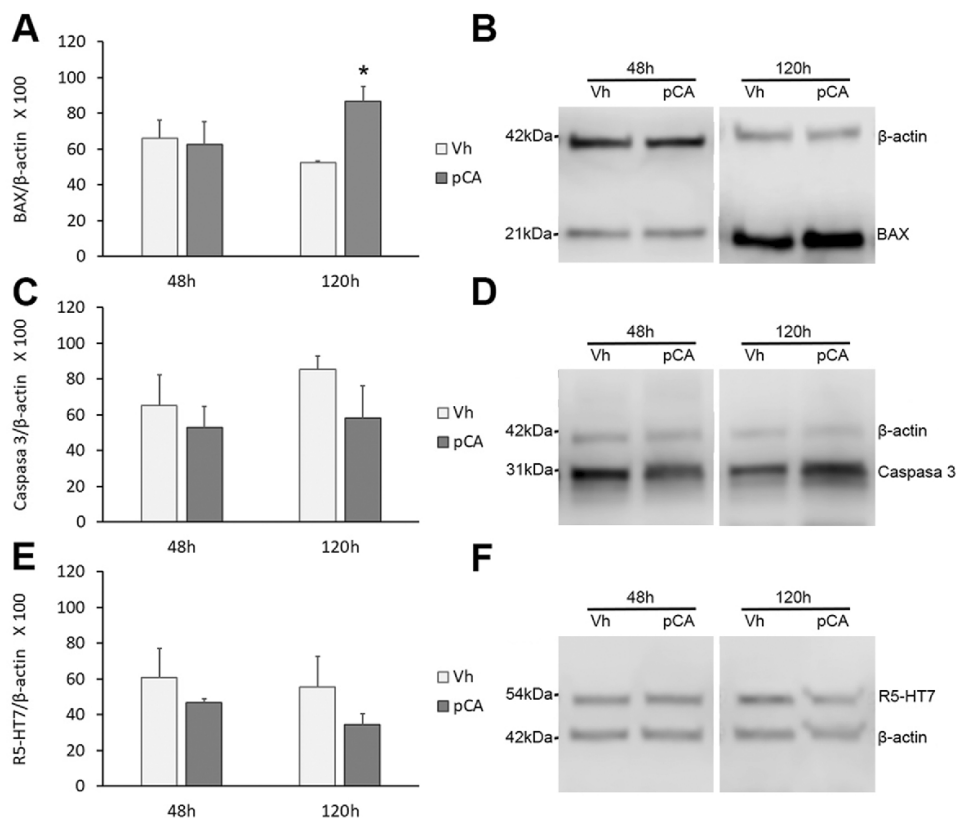


Fig. 8. Effects of p-chloroamphetamine on the expression of Bax (A, B), Caspase 3 (C, D) and R5-HT₇ (E, F). The expression of proteins was analyzed in the ovaries of rats injected intraperitoneally with 0.9% NaCl (Vh) (light gray) or 10 mg/kg p-chloroamphetamine (pCA) dissolved in saline (dark gray) and euthanized 48 or 120 h after treatment (A, C, E). Protein expression was normalized to β-actin (B, D, F). Representative results of Western Blot of Bax, caspase 3 and R5-HT₇ proteins. *p 0.0029.

follicles were observed at different stages of development, with TUNEL-positive (apoptotic) cells. TUNEL-positive cells were detected in granulosa cells of the median and preovulatory atretic follicles. These cells were located predominantly in the layers that limit the antrum. Theca cells did not exhibit TUNEL-positive staining in the follicles (Fig. 5 D-I). Only some oocytes from follicles with characteristics of atresia exhibited TUNEL-positive staining. No TUNEL-positive staining was observed in the negative control (Fig. 5 A-C).

When the proportion of follicles with TUNEL-positive granulosa cells was evaluated in the animals treated with pCA and euthanized at 48 h and 120 h after treatment, the proportion of small, medium and preovulatory follicles with moderate staining decreased ($p < 0.0001$, for all groups). The proportion of follicles with intense staining was higher in small, medium and preovulatory follicles ($p < 0.0001$, for all groups) (Fig. 6).

3.4. R5-HT₇

The expression of the R5-HT₇ was identified in the follicles at different stages of development of rats treated with vehicle or with pCA. The expression of this receptor was limited to the oocytes of primordial to preovulatory follicles (Fig. 7 D-I). No staining was observed in the negative controls (Fig. 7 A-C).

3.5. Expression of Bax, caspase 3 and R5-HT₇ proteins

Compared with the animals injected with vehicle, in the ovaries of rats injected with pCA, the relative content of Bax protein at 48 h post-treatment was not altered ($p = 0.8267$) and increased at 120 h after treatment ($p = 0.0029$) (Fig. 8A and B). The expression of caspase 3 protein (48 h $p = 0.5645$; 120 h $p = 0.1976$) (Fig. 7C and D) and the R5-HT₇ (48 h $p = 0.4256$; 120 h $p = 0.2863$) were not altered at any of the times studied (Fig. 8E and F).

4. Discussion

The results of the present study show that the inhibition of the serotonergic system induced by the injection of pCA increases follicular atresia, the number of TUNEL-positive granulosa cells and the expression of the pro-apoptotic Bax protein. Such effects may be related to low estradiol secretion, a survival factor of granulosa cells.

In the present study, the decrease in the 5-HT concentration in the anterior and medial hypothalamus of animals injected with pCA suggests that pCA inhibits serotonergic neurons arising from the dorsal and medial raphe nuclei [39,40]. This effect was previously demonstrated [4,33,41,42] and is the result of the inhibition of the enzyme tryptophan hydroxylase [33,41]. This effect is evident at 48 h after treatment and is maintained for up to 30 days [4].

We showed that the effects of pCA on the serotonergic system of the ovary are different from those observed on the hypothalamus. The

concentration of 5-HT increased at 48 h, and decreased at 120 h. In the CNS, the initial effect of pCA is the release of 5-HT stored in the terminals of serotonergic neurons. The ovary contains no serotonergic innervation, and the sources of 5-HT are platelets, mast cells and *de novo* synthesis. Therefore, it is possible that pCA induced the release of 5-HT stores in platelets, an effect that was previously described [42]. *In vitro*, pCA stimulates the efflux of 5-HT stored in platelets via the 5-HT transporter, causing the release of 75% of the 5-HT stored in platelets [43,44].

The inhibitory effect of pCA on 5-HT synthesis occurs later in the ovary than in the CNS. This is possibly related to the isoform of TPH present in both regions; TPH2 is found in the CNS and is more sensitive to the effects of amphetamines [45], and TPH1 is expressed in the ovary [26] and is more resistant to these substances [45].

We observed that dysregulation of the serotonergic system in the hypothalamus and ovary resulted in a decrease in estradiol concentration, while the testosterone concentration did not change. Based on these results, we suggest that the activity of the p450 aromatase enzyme decreased. This enzyme regulates the conversion of theca-derived testosterone into estradiol [46]. FSH promotes steroidogenesis in granulosa cells, activating the p450 aromatase enzyme [15].

The administration of 5-hydroxytryptophan, the precursor of 5-HT synthesis [47], or 5-HT [9] in prepubertal female rats increases the FSH concentration. Therefore, we propose that the diminution of the concentration of 5-HT in the anterior hypothalamus modified the production of FSH, which was accompanied by decrease in p450 aromatase enzyme activity in the ovary and serum estradiol concentration.

Another possibility is that the dysregulation of the concentration of 5-HT in the ovary generated vasoconstriction of vessels that vascularize the ovary. Consequently, the availability of FSH, the activity of the p450 aromatase enzyme and the aromatization of testosterone to estradiol decreased. This mechanism is supported by evidence showing that 5-HT induces vasoconstriction in the arteries that supply the liver, kidney and testicle [48,49].

The stimulating effect of 5-HT on the synthesis of estradiol by ovarian follicles has been reported in rats [10,50] and in humans [51, 52]. Based on this evidence, we propose that pCA acted directly on the serotonergic system in the ovary and modified estradiol production. The mechanism of action of 5-HT in the regulation of steroidogenesis is unclear.

The SERT protein is responsible of re-uptake of 5-HT and regulates its extracellular concentration [53]. In the ovaries of mice, this protein is present in both granulosa cells and oocytes [54]. SERT protein is inhibited by pCA [55,56]. In the CNS of male rats, pCA decreased the expression of SERT [56] and 5-HT binding [55]. In female SERT-knockout mice or with pharmacological blockade of SERT protein, decreased expression of aromatase was observed in the ovary. In light of these studies, we propose that 5-HT regulates steroidogenesis in the ovary via the SERT protein and modifies P450 aromatase enzyme activity [57]. In addition, in the trophoblasts of women, the binding of 5-HT to the 5-HT_{2A} receptor activates aromatase [58–61]. This evidence reinforces the proposal that 5-HT stimulates p450 aromatase activity.

5-HT regulates GnRH secretion and gonadotropins and ovulation and steroidogenesis in the ovary [9,62]. This study is the first to provide evidence that dysregulation of the serotonergic system in the ovary increases granulosa cell apoptosis and induces follicular atresia. Based on pharmacological studies, the binding of 5-HT to its 5-HT₁ and 5-HT₂ receptors results in the stimulation of estradiol secretion [10,63]. These receptors are expressed in both oocytes and granulosa cells [26]. These evidences supported the idea that 5-HT acts on granulosa cells. In the present study, we showed that the R5-HT₇ is also expressed in oocytes from follicles at different stages of development. There is no evidence that the binding of 5-HT to the R5-HT₇ activates signaling pathways that regulate steroidogenesis, which requires future studies; however, this possibility cannot be ruled out.

The present study supports our hypothesis that the dysregulation of

the serotonergic system compromises estradiol production and follicular growth. The increases in atretic follicles observed in the animals injected with pCA could be related to a decrease in estradiol concentration. This steroid stimulates follicle growth by increasing granulosa cell mitosis and follicle reactivity to the FSH signal [12,64,65]. Therefore, it is possible that the decrease in the estradiol concentration consequently decreased follicle granulosa cell reactivity to FSH and the proliferation of granulosa cells, which explains the increase in follicular atresia.

According to Hughes and Gorospe (1991), follicular atresia is associated with granulosa cell apoptosis. In addition, estrogens are anti-apoptotic hormones [21,66]. When the rat was treated with the antiestrogen clomiphene citrate, the expression of the proapoptotic protein Bax and apoptosis in cumulus granulosa cells increased, an effect that was reversed when estradiol was administered [24]. In the present study, we observed that in the rats injected with pCA, the increase in follicular atresia was associated with a) an increase in the number of medium follicles (200–400 μ m) and large or preovulatory follicles (> 400 μ m) with TUNEL-positive granulosa cells; b) a decrease in estradiol concentration. Based on the present results and those available in the primary literature, we propose that the increase in follicular atresia observed in animals treated with pCA results from the increase in granulosa cell apoptosis caused by the decrease in estradiol concentration, a survival hormone of granulosa cells [67].

Another possibility is that the increase in granulosa cell apoptosis may be the result of the dysregulation of the 5-HT concentration in the ovary. This idea is supported by the following evidences: 1) serotonin 5-HT₁, 5-HT₂ and 5-HT₇ receptors are distributed in the granulosa cells of follicles [25,68]; 2) 5-HT binding to these receptors has been associated with apoptosis in different tissues [32,69]; 3) when 5-HT binds to the 5-HT₂ receptor, it increases apoptosis in cortical neurons of rat [70] and mouse hepatocytes [71] and increases the expression of caspase 3 and Bax, respectively; 4) in human monocytes, the stimulation of 5-HT₁ and 5-HT₇ receptors decreases apoptosis and the expression of caspase 3, while it increases Bcl-2 [32]. These evidences led us to propose that 5-HT inhibits or activates apoptosis depending on the kind of receptor that 5-HT activates.

In the ovary, there is no evidence that the binding of 5-HT to the R5-HT₇ activates signaling pathways associated with cell proliferation or granulosa cell apoptosis in the follicles. The increased number of TUNEL-positive cells in follicles and the atresia observed in the ovaries of the animals injected with pCA were not accompanied by changes in the expression of the R5-HT₇. This apparent lack of changes can be because in the bioassay, all the ovarian tissue was evaluated, and the expression of this receptor was not quantified exclusively in the granulosa cells.

The increase in the expression of the proapoptotic protein Bax at 120 h may be the result of the decrease in the concentration of estradiol, which stimulates the expression of the antiapoptotic protein Bcl-2 and inhibits the expression of the proapoptotic protein Bax [12,72]. Therefore, the decrease in the concentration of estradiol results in an imbalance of Bcl-2 and Bax, favoring proapoptotic activity, DNA fragmentation, apoptosis in granulosa cells and follicular atresia.

In our study, in the ovaries of rats injected with pCA, the expression of caspase 3 protein was not modified. It has been reported that apoptosis can occur independently of the activation of this caspase [73, 74]. This idea is supported by observations in *in vitro* cultures of hamster ovarian tissue [73] and mammary gland cancer cells (MCF-7-cell line) [74]; apoptosis occurs without caspase 3 activation, but caspase 7 is activated. Based on this evidence, it is possible that in the animals injected with pCA, the decrease in the concentration of estradiol led to the increase in Bax expression and DNA fragmentation by a pathway independent of caspase 3 activation, which culminated in the increase in TUNEL-positive (apoptotic) granulosa cells and follicular atresia.

5. Conclusion

In summary, based on the results of this study, in prepubescent rats, we propose that amphetamine derivatives induce the dysregulation of the serotonergic system in the hypothalamus and ovary, negatively impacting the production of estradiol. This hormone stimulates mitosis and the survival of granulosa cells, resulting in ovarian follicle growth. Therefore, it is possible that the abuse of amphetamine derivatives affects women's fertility because it increases granulosa cell apoptosis and follicular atresia.

Declaration of Competing Interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgements

We thank the Graduate Program in Biological Sciences from the National Autonomous University of Mexico and CONACYT for the support provided for this study. This work is part of the academic requirements requested to Eloir Gallegos Pacheco for obtaining The Doctor in Biological Sciences degree. This work was supported by grants [grants numbers UNAM-DGAPA-PAPIIT IN226017 IN218920 and IN221018].

Authors contributions

Eloir Gallegos Pacheco, performed the experiments, participated in the analysis, discussion of the results and wrote the manuscript; Juana Monroy Moreno, participated in measured of serotonin by chromatography; Marta Elena Castro-Manreza, performed the experiments of Western Blott; Marisol Ascona Vázquez, Performed the experiments; María Elena Ayala, designed the experiments and wrote the manuscript; Andrés Aragón Martínez, performed statistical analyses and participated in the analysis and discussion of the results. All authors read and approved the final manuscript.

Appendix A. Supporting information

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at [doi:10.1016/j.reprotox.2022.04.006](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.04.006).

References

- [1] M.G. Henderson, K.W. Perry, R.W. Fuller, Possible involvement of dopamine in the long-term serotonin depletion by p-chloroamphetamine and beta,beta-difluoro-p-chloroamphetamine in rats, *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 267 (1993) 417–424.
- [2] I.C. Yang, J.T. Pan, Effects of serotonin depletion by p-chlorophenylamine, p-chloroamphetamine or 5,7-dihydroxytryptamine on central dopaminergic neurons: focus on tuberoinfundibular dopaminergic neurons and serum prolactin, *J. Biomed. Sci.* 6 (1999) 183–193, <https://doi.org/10.1007/BF02255902>.
- [3] M.M. Foreman, J.L. Hall, R.L. Love, Effects of fenfluramine and para-chloroamphetamine on sexual behavior of male rats, *Psychopharmacology* 107 (1992) 327–330, <https://doi.org/10.1007/BF02245156>.
- [4] M.A. Aragón, M.E. Ayala, M. Marín, A. Avilés, P. Damián-Matsumura, R. Domínguez, Serotonergic system blockage in the prepubertal rat inhibits spermatogenesis development, *Reprod. Camb.* 129 (2005) 717–727, <https://doi.org/10.1530/rep.1.00598>.
- [5] J. Díaz-Ramos, M. Flores-Flores, M.E. Ayala, A. Aragón-Martínez, Impaired serotonin communication during juvenile development in rats diminishes adult sperm quality, *Syst. Biol. Reprod. Med.* 64 (2018) 340–347, <https://doi.org/10.1080/19396368.2018.1472825>.
- [6] M.E. Apfelbaum, Effect of serotonin on the basal and gonadotrophin-releasing hormone-induced release of luteinizing hormone from rat pituitary glands in vitro, *Life Sci.* 41 (1987) 2069–2076, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(87\)90482-6](https://doi.org/10.1016/0024-3205(87)90482-6).
- [7] J.A. Mogulivsky, W. Wuttke, Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes Off. J. Ger. Soc. Endocrinol. Ger. Diabetes Assoc.* 109 (2001) 188–195, <https://doi.org/10.1055/s-2001-15105>.
- [8] E.M. Gouveia, C.R. Franci, Involvement of serotonin 5HT1 and 5HT2 receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion, *Brain Res. Bull.* 63 (2004) 243–251, <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2004.03.002>.
- [9] M.J. Moran, M.E. Ayala, E. Gallegos, J. Romero, R. Chavira, P. Damián-Matsumura, R. Domínguez, 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, <https://doi.org/10.1071/RD12253>.
- [10] E. Tanaka, N. Baba, K. Tshida, K. Suzuki, Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT2 receptor, *Life Sci.* 53 (1993) 563–570, [https://doi.org/10.1016/0024-3205\(93\)90713-4](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90713-4).
- [11] H.S. Kim, S. Yumkham, J.H. Choi, G.H. Son, K. Kim, S.H. Ryu, P.-G. Suh, Serotonin stimulates GnRH secretion through the c-Src-PLC gamma1 pathway in GT1-7 hypothalamic cells, *J. Endocrinol.* 190 (2006) 581–591, <https://doi.org/10.1677/joe.1.06727>.
- [12] F. Matsuda, N. Inoue, N. Manabe, S. Ohkura, Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells, *J. Reprod. Dev.* 58 (2012) 44–50, <https://doi.org/10.1262/jrd.2011-012>.
- [13] J. Findlay, J. Kerr, K. Britt, S. Liew, E. Simpson, D. Rosairo, A. Drummond, Ovarian physiology: follicle development, oocyte and hormone relationships, *Anim. Reprod.* 6 (2009) 16–19.
- [14] P. Lin, R. Rui, Effects of follicular size and FSH on granulosa cell apoptosis and atresia in porcine antral follicles, *Mol. Reprod. Dev.* 77 (2010) 670–678, <https://doi.org/10.1002/mrd.21202>.
- [15] L. Casarini, P. Crépeux, Molecular mechanisms of action of FSH, *Front. Endocrinol.* 10 (2019) 305, <https://doi.org/10.3389/fendo.2019.00305>.
- [16] Y. Munakata, M. Ueda, R. Kawahara-Miki, K. Kansaku, N. Itami, K. Shirasuna, T. Kuwayama, H. Iwata, Follicular factors determining granulosa cell number and developmental competence of porcine oocytes, *J. Assist. Reprod. Genet.* 35 (2018) 1809–1819, <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1247-9>.
- [17] F.M. Hughes, W.C. Gorospe, Biochemical identification of apoptosis (programmed cell death) in granulosa cells: evidence for a potential mechanism underlying follicular atresia, *Endocrinology* 129 (1991) 2415–2422, <https://doi.org/10.1210/endo-129-5-2415>.
- [18] M.A. Fenwick, P.R. Hurst, Immunohistochemical localization of active caspase-3 in the mouse ovary: growth and atresia of small follicles, *Reprod. Camb.* 124 (2002) 659–665, <https://doi.org/10.1530/rep.0.1240659>.
- [19] K.A. Slot, M. Voorendt, M. de Boer-Brouwer, H.H. van Vugt, K.J. Teerds, Estrous cycle dependent changes in expression and distribution of Fas, Fas ligand, Bcl-2, Bax, and pro- and active caspase-3 in the rat ovary, *J. Endocrinol.* 188 (2006) 179–192, <https://doi.org/10.1677/joe.1.06165>.
- [20] S. Elmore, Apoptosis: a review of programmed cell death, *Toxicol. Pathol.* 35 (2007) 495–516, <https://doi.org/10.1080/01926230701320337>.
- [21] Y.S. Yu, H.S. Sui, Z.B. Han, W. Li, M.J. Luo, J.H. Tan, Apoptosis in granulosa cells during follicular atresia: relationship with steroids and insulin-like growth factors, *Cell Res.* 14 (2004) 341–346, <https://doi.org/10.1038/sj.cr.7290234>.
- [22] H. Billig, I. Furuta, A.J. Hsueh, Estrogens inhibit and androgens enhance ovarian granulosa cell apoptosis, *Endocrinology* 133 (1993) 2204–2212, <https://doi.org/10.1210/endo.133.5.8404672>.
- [23] K. Toda, K. Takeda, T. Okada, S. Akira, T. Saibara, T. Kaname, K. Yamamura, S. Onishi, Y. Shizuta, Targeted disruption of the aromatase P450 gene (Cyp19) in mice and their ovarian and uterine responses to 17beta-oestradiol, *J. Endocrinol.* 170 (2001) 99–111, <https://doi.org/10.1677/joe.0.1700099>.
- [24] S.K. Chaube, P.V. Prasad, S.C. Thakur, T.G. Shrivastav, Estradiol protects domiphen citrate-induced apoptosis in ovarian follicular cells and ovulated cumulus-oocyte complexes, *Fertil. Steril.* 84 (2) (2005) 1163–1172, <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2005.03.073>.
- [25] P. Amireault, F. Dubé, Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos, *Biol. Reprod.* 73 (2005) 358–365, <https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.039313>.
- [26] F. Dubé, P. Amireault, Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos, *Life Sci.* 81 (2007) 1627–1637, <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.034>.
- [27] P.H. Terranova, J.T. Uilenbroek, I. Saville, D. Horst, Y. Nakamura, Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles in vitro: effects of experimentally induced atresia, *J. Endocrinol.* 125 (1990) 433–438, <https://doi.org/10.1677/joe.0.1250433>.
- [28] Y. Sheng, L. Wang, X.S. Liu, V. Montplaisir, M. Tiberi, J.M. Baltz, X.J. Liu, A serotonin receptor antagonist induces oocyte maturation in both frogs and mice: evidence that the same G protein-coupled receptor is responsible for maintaining meiosis arrest in both species, *J. Cell. Physiol.* 202 (2005) 777–786, <https://doi.org/10.1002/jcp.20170>.
- [29] J. Romero-Reyes, M. Cárdenas, P. Damián-Matsumura, R. Domínguez, M.E. Ayala, Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions, *Reprod. Toxicol. Elmsford N.* 59 (2016) 80–88, <https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.12.006>.
- [30] E.C. Azmitia, Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis, *Brain Res. Bull.* 56 (2001) 413–424, [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(01\)00614-1](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(01)00614-1).
- [31] E.C. Azmitia, R.B. Murphy, P.M. Whitaker-Azmitia, MDMA (ecstasy) effects on cultured serotonergic neurons: evidence for Ca2(+)-dependent toxicity linked to release, *Brain Res.* 510 (1990) 97–103, [https://doi.org/10.1016/0006-8993\(90\)90732-q](https://doi.org/10.1016/0006-8993(90)90732-q).
- [32] F. Soga, N. Katoh, T. Inoue, S. Kishimoto, Serotonin activates human monocytes and prevents apoptosis, *J. Invest. Dermatol.* 127 (2007) 1947–1955, <https://doi.org/10.1038/sj.jid.5700824>.

- [33] E. Sanders-Bush, J.A. Bushing, F. Sulser, p-Chloroamphetamine-inhibition of cerebral tryptophan hydroxylase, *Biochem. Pharmacol.* 21 (1972) 1501–1510, [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(72\)90375-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(72)90375-9).
- [34] G. Paxinos, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates - 6th Edition*, n.d. (<https://www.elsevier.com/books/the-rat-brain-in-stereotaxic-coordinates/paxinos/978-0-12-374121-9>) (accessed March 20, 2021).
- [35] T.G. Heffner, J.A. Hartman, L.S. Seiden, A rapid method for the regional dissection of the rat brain, *Pharmacol. Biochem. Behav.* 13 (1980) 453–456, [https://doi.org/10.1016/0091-3057\(80\)90254-3](https://doi.org/10.1016/0091-3057(80)90254-3).
- [36] M.E. Ayala, J. Monroy, L. Morales, M.E. Castro, R. Domínguez, Effects of a lesion in the dorsal raphe nuclei performed during the juvenile period of the female rat, on puberty, *Brain Res. Bull.* 47 (1998) 211–218, [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(98\)00074-4](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(98)00074-4).
- [37] W.S. Rasband, Image J, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA, 1997. (<https://imagej.nih.gov/ij/>).
- [38] C.J. Hubbard, B. Oxberry, Follicular atresia, in: G. Familiari, S. Makabe, P.M. Motta (Eds.), *Ultrastruct. Ovary*, Springer US, Boston, MA, 1991, pp. 273–285, <https://doi.org/10.1007/978-1-4615-3944-5-17>.
- [39] 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, <https://doi.org/10.1002/ar.1092330315>.
- [40] J.P. Ruddick, A.K. Evans, D.J. Nutt, S.L. Lightman, G.A.W. Rook, C.A. Lowry, Tryptophan metabolism in the central nervous system: medical implications, *Expert Rev. Mol. Med.* 8 (2006) 1–27, <https://doi.org/10.1017/S1462399406000608>.
- [41] E. Sanders-Bush, J.A. Bushing, F. Sulser, Long-term effects of p-chloroamphetamine on tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole acetic acid in brain, *Eur. J. Pharmacol.* 20 (1972) 385–388, [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(72\)90204-x](https://doi.org/10.1016/0014-2999(72)90204-x).
- [42] F. Martín, F. Artigas, Simultaneous effects of p-chloroamphetamine, d-fenfluramine, and reserpine on free and stored 5-hydroxytryptamine in brain and blood, *J. Neurochem.* 59 (1992) 1138–1144, <https://doi.org/10.1111/j.1471-4159.1992.tb08356.x>.
- [43] G. Rudnick, S.C. Wall, p-Chloroamphetamine induces serotonin release through serotonin transporters, *Biochemistry* 31 (1992) 6710–6718, <https://doi.org/10.1021/bi00144a010>.
- [44] S. Yubero-Lahoz, M.A. Aiestas, B.E. Blough, J.S. Partilla, R.B. Rothman, R. de la Torre, M.H. Baumann, Effects of MDMA and related analogs on plasma 5-HT: relevance to 5-HT transporters in blood and brain, *Eur. J. Pharmacol.* 674 (2012) 337–344, <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2011.10.033>.
- [45] Y.N. Zhang, Effect of morphine and endorphins on endocrine reproductive activity, *Sheng Li Ke Xue Jin Zhan* 14 (1983) 82–84.
- [46] E.Y. Adashi, Endocrinology of the ovary, *Hum. Reprod.* 9 (1994) 815–827, <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a138602>.
- [47] I.M. Lacañ-Mengido, C. Libertun, D. Becú-Villalobos, Different serotonin receptor types participate in 5-hydroxytryptophan-induced gonadotropins and prolactin release in the female infantile rat, *Neuroendocrinology* 63 (1996) 415–421, <https://doi.org/10.1159/000127089>.
- [48] K. Endlich, R. Kühn, M. Steinhilber, Visualization of serotonin effects on renal vessels of rats, *Kidney Int.* 43 (1993) 314–323, <https://doi.org/10.1038/ki.1993.49>.
- [49] M. Verbeke, B. Smidlich, J. van de Voorde, L. de Ridder, N. Lameire, Beneficial influence of ketanserin on autoregulation of blood flow in post-ischemic kidneys, *J. Am. Soc. Nephrol.* JASN 7 (1996) 621–627, <https://doi.org/10.1681/ASN.7.4.621>.
- [50] C.-K. Yang, R.S.-C. Wu, C.-H. Wu, T.R.-Y. Lin, H.-D. Tsai, Sleep deprivation enhances peripheral serotonin secretion to regulate the large follicle steroidogenesis of rats, *Taiwan. J. Obstet. Gynecol.* 54 (2015) 260–265, <https://doi.org/10.1016/j.tjog.2014.10.007>.
- [51] J. Bodis, A. Török, H.R. Tinneberg, V. Hanf, M. Hamoci, P. Cledon, Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells, *Fertil. Steril.* 57 (1992) 1008–1011, [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)55017-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)55017-1).
- [52] M. Koppán, J. Bodis, Z. Verzar, H.-R. Tinneberg, A. Torok, Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in superfusion system, *Endocrine* 24 (2004) 155–159, <https://doi.org/10.1385/ENDO:24:2:155>.
- [53] J.G. Hensler, Chapter 15 - serotonin, in: S.T. Brady, G.J. Siegel, R.W. Albers, D. L. Price (Eds.), *Basic Neurochemistry*, Eighth ed., Academic Press, New York, 2012, pp. 300–322, <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374947-5.00015-8>.
- [54] D.A. Nikishin, N.M. Alyoshina, Y.B. Shmukler, Synthesis and membrane transport of serotonin in the developing ovarian follicle of mouse, *Dokl. Biochem. Biophys.* 478 (2018) 4–7, <https://doi.org/10.1134/S1607672918010027>.
- [55] A.M. Belcher, S.J. O'Dell, J.F. Marshall, Impaired object recognition memory following methamphetamine, but not p-chloroamphetamine- or d-amphetamine-induced neurotoxicity, *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll.*
- Neuropsychopharmacol.* 30 (2005) 2026–2034, <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1300771>.
- [56] T. Xie, L. Tong, M.W. McLane, G. Hatzidimitriou, J. Yuan, U. McCann, G. Ricaurte, Loss of serotonin transporter protein after MDMA and other ring-substituted amphetamines, *Neuropsychopharmacol. Off. Publ. Am. Coll.*
- Neuropsychopharmacol.* 31 (2006) 2639–2651, <https://doi.org/10.1038/sj.npp.1301031>.
- [57] W. Zha, H.T.B. Ho, T. Hu, M.F. Hebert, J. Wang, Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance, *Sci. Rep.* 7 (2017) 1137, <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01291-5>.
- [58] A.-A. Hudon-Thibeault, L. Laurent, S. Vo Duy, S. Sauvé, P. Caron, C. Guillemette, J. T. Sanderson, C. Vaillancourt, Fluoxetine and its active metabolite norfluoxetine disrupt estrogen synthesis in a co-culture model of the foetal placental unit, *Mol. Cell. Endocrinol.* 442 (2017) 32–39, <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.11.021>.
- [59] A.-A. Hudon-Thibeault, Y. López de Los Santos, N. Doucet, J.T. Sanderson, C. Vaillancourt, Serotonin and serotonin reuptake inhibitors alter placental aromatase, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 195 (2019), 105470, <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2019.105470>.
- [60] N.W. Jacobsen, C.H. Hansen, C. Nedemann, B. Styriehausen, B. Halling-Sørensen, Effects of selective serotonin reuptake inhibitors on three sex steroids in two versions of the aromatase enzyme inhibition assay and in the H295R cell assay, *Toxicol. In Vitro* 29 (2015) 1729–1735, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2015.07.005>.
- [61] T. Klempan, A.-A. Hudon-Thibeault, T. Oufkir, C. Vaillancourt, J.T. Sanderson, Stimulation of serotonergic 5-HT2A receptor signaling increases placental aromatase (CYP19) activity and expression in BeWo and JEG-3 human chorionic carcinoma cells, *Placenta* 32 (2011) 651–656, <https://doi.org/10.1016/j.placenta.2011.06.003>.
- [62] M.E. Castro, M.E. Ayala, J. Monroy, R. Chavira, P. Damian-Matsumura, R. Domínguez, Changes in monoaminergic activity in the anterior, medium and posterior hypothalamus, gonadotropins levels and ovarian hormones during puberty of the female rat, *Brain Res. Bull.* 54 (2001) 345–352, [https://doi.org/10.1016/s0361-9230\(00\)00421-4](https://doi.org/10.1016/s0361-9230(00)00421-4).
- [63] G. Schmidt, P. Kannisto, C. Owan, N.O. Sjöberg, Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused in vitro? *Acta Physiol. Scand.* 132 (1988) 251–256, <https://doi.org/10.1111/j.1748-1716.1988.tb08324.x>.
- [64] H.H. Ortega, B.E. Marelli, F. Rey, A.N. Amweg, P.U. Díaz, M.L. Stangaferro, N. R. Salvetti, Molecular aspects of bovine cystic ovarian disease pathogenesis, *Reprod. Camb.* 149 (2015) R251–R264, <https://doi.org/10.1530/REP-14-0618>.
- [65] S.M. Quirk, R.G. Cowan, R.M. Harman, C.-L. Hu, D.A. Porter, Ovarian follicular growth and atresia: the relationship between cell proliferation and survival, *J. Anim. Sci.* (2004) E40–E52, <https://doi.org/10.2527/2004.8213.supp1E40x>.
- [66] S.A. Wandji, J.J. Eppig, J.E. Fortune, FSH and growth factors affect the growth and endocrine function in vitro of granulosa cells of bovine preantral follicles, *Theriogenology* 45 (1996) 817–832, [https://doi.org/10.1016/0093-691x\(96\)00011-8](https://doi.org/10.1016/0093-691x(96)00011-8).
- [67] A. Amsterdam, I. Keren-Tal, D. Aharoni, A. Dantes, A. Land-Bracha, E. Rimon, R. Sasson, L. Hirsch, Steroidogenesis and apoptosis in the mammalian ovary, *Steroids* 68 (2003) 861–867, <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.09.003>.
- [68] J. Veselá, P. Reháč, J. Mihalík, S. Čizková, J. Pokorný, J. Koppel, Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos, *Physiol. Res.* 52 (2003) 223–228.
- [69] I. Cinar, B. Sirin, Z. Halici, S.S. Palabiyik-Yucelik, E. Akpınar, E. Cadirci, 5-HT7 receptors as a new target for prostate cancer pathophysiology and treatment: an experimental study on PC3 cells and FFP6 tissues, *Naunyn. Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 394 (2021) 1205–1213, <https://doi.org/10.1007/s00210-021-02051-z>.
- [70] J.P. Capda, E. Fernandes, F. Remião, M.L. Bastos, A. Meisel, F. Carvalho, Ecstasy induces apoptosis via 5-HT(2A)-receptor stimulation in cortical neurons, *Neurotoxicology* 28 (2007) 868–875, <https://doi.org/10.1016/j.neuro.2007.04.005>.
- [71] Q. Pang, H. Jin, X. Ke, Z. Man, Y. Wang, Y. Tan, Z. Lu, H. Liu, The Role of Serotonin in Concanavalin A-Induced Liver Injury in Mice, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2020 (2020), 7504521, <https://doi.org/10.1155/2020/7504521>.
- [72] V. Zaldivar, M.L. Magri, S. Zárate, G. Jaita, G. Eijo, D. Radl, J. Ferraris, D. Pisera, A. Seilicovich, Estradiol increases the Bax/Bcl-2 ratio and induces apoptosis in the anterior pituitary gland, *Neuroendocrinology* 90 (2009) 292–300, <https://doi.org/10.1159/000235618>.
- [73] I. Kitazumi, Y. Maseki, Y. Nomura, A. Shimazaki, Y. Sugita, M. Tsukahara, Okadaic acid induces DNA fragmentation via caspase-3-dependent and caspase-3-independent pathways in Chinese hamster ovary (CHO)-KI cells, *FEBS J.* 277 (2010) 404–412, <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2009.07493.x>.
- [74] Y. Liang, C. Yan, N.F. Schor, Apoptosis in the absence of caspase 3, *Oncogene* 20 (2001) 6570–6578, <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204815>.
- [75] M. Friendly, Mosaic displays for multi-way contingency tables, *J. Am. Stat. Assoc.* 89 (1994) 190–200, <https://doi.org/10.1080/01621459.1994.10476460>.