



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFEECTO DE LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA
SEROTONINÉRGICO EN LA IDENTIFICACIÓN DEL
R-5HT7 Y CUANTIFICACIÓN DE CYP17-HIDROXILASA Y
17B-HSD EN EL OVARIO DE RATA**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

PRESENTA:

XIMENA YAZMÍN GARCÍA BUSTAMANTE

DIRECTORA: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR



**FES
ZARAGOZA**

CIUDAD DE MÉXICO

SEPTIEMBRE DE 2023



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
CARRERA DE BIOLOGÍA
FORMATO F-5



OFICIO DE FECHA DE EXAMEN

QFB GRACIELA ROJAS VÁZQUEZ
JEFA DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR
 Presente

Le comunico que al alumno: **GARCIA BUSTAMANTE XIMENA YAZMIN** con número de cuenta **316222974** de la carrera **BIOLOGÍA** se le ha fijado el día **26 de Septiembre de 2023** a las **16:00 hrs.**, para presentar la réplica oral de su examen profesional, que tendrá lugar en esta facultad, ante el siguiente jurado:

CARGO	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE MTRA.	FLORES RAMIREZ ANGELICA	
VOCAL DRA.	AYALA ESCOBAR MARIA ELENA	
SECRETARIO DRA.	ROLDAN REYES ELIA	
SUPLENTE DRA.	MONROY MORENO JUANA	
SUPLENTE DRA.	VIEYRA VALDEZ ELIZABETH	

El título del trabajo escrito que se presenta es:

Efecto de la inhibición del sistema serotoninérgico en la identificación del R5HT7 y la cuantificación de CYP17-Hidroxilasa y 17β-HSD en el ovario de rata

En la modalidad de: **TESIS**

A T E N T A M E N T E
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
 CDMX, a 28 de Agosto de 2023

DR. VICENTE JESÚS HERNÁNDEZ ABAD
 DIRECTOR DE LA FACULTAD DE ESTUDIOS
 SUPERIORES ZARAGOZA



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

CARRERA DE BIOLOGÍA

**EFFECTO DE LA INHIBICIÓN DEL SISTEMA
SEROTONINÉRGICO EN LA IDENTIFICACIÓN DEL R-
5HT7 Y CUANTIFICACIÓN DE CYP17-HIDROXILASA Y
17B-HSD EN EL OVARIO DE RATA**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOLOGÍA

PRESENTA:
XIMENA YAZMÍN GARCÍA BUSTAMANTE

JURADO DE EXAMEN

DIRECTORA: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

ASESORA: DRA. JUANA MONROY MORENO

ASESORA: MTRA. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

SINODAL: DRA. ELIA ROLDÁN REYES

SINODAL: DRA. ELIZABETH VIEYRA VALDEZ



**FES
ZARAGOZA**

CIUDAD DE MÉXICO

SETIEMBRE DE 2023

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

A la **Facultad de Estudios Superiores Zaragoza** de la **Universidad Nacional Autónoma de México** por brindarme la oportunidad de crecer profesionalmente.

Por el financiamiento otorgado por el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (**UNAM-DGAPA-PAPIIT-IN226017 y IN218920**).

Al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica**, por otorgarme una beca durante mi proceso de titulación con el folio **301622** en el proyecto **IN218920**.

A mi asesora, la **Dra. María Elena Ayala Escobar**, quien ha sido un ejemplo académico y profesional en mi formación como bióloga.

A los miembros de mi comité tutorial y miembros del jurado de mi examen, por su apoyo, dedicación y orientación durante mi formación académica:

M. en IBSH Angelica Flores Ramírez

Dra. Juana Monroy Moreno

Dra. Elia Roldán Reyes

Dra. Elizabeth Vieyra Valdez

AGRADECIMIENTOS

Al equipo responsable del bioterio de la FES-Zaragoza, los **M.V.Z. Adriana Altamirano Bautista, Román Hernández Meza y Dolores Elizabeth Guzmán Andrade**, por su invaluable trabajo en el cuidado y mantenimiento de los animales, sin ellos no habría sido posible la realización de este estudio.

A los miembros de la Facultad de Estudios Superiores Iztacala, el **Dr. Andrés Aragón Martínez y la Dra. Cindy Rivas Arzaluz**, por su colaboración en el desarrollo de las pruebas de inmunohistoquímica.

A los miembros del Laboratorio de Pubertad; **Dra. Juana Monroy, Dr. Eloir Gallegos**, a los Inter laboratoristas, la **Sra. Dulce** y la **Sra. Gaby**, quienes me brindaron su conocimiento y colaboración en el desarrollo de mi investigación.

A **mi familia**, sin su ayuda jamás habría llegado hasta aquí, gracias por su apoyo incondicional su amor y paciencia.

A mis compañeros de laboratorio, **Denisse, Emiliano, Ashael, Ale, Antonio y Vivian**, por el tiempo, el apoyo y la convivencia que me brindaron.

A mis amigos de la Facultad, "**Los mentirosos**", por todas las horas de estudio y risas que tuvimos, por la amistad tan bonita que me dieron.

A los amigos que me acompañan desde **Prepa 7, "Crew"**, muchas gracias, a pesar de que todos estamos en diferentes facultades siempre me apoyaron y mostraron interés en mi carrera, su amistad se ha convertido en un tesoro para mí, ustedes siempre serán mi familia.

A **Ehe, mi mate**, por esperarme despierto mientras terminaba mi tarea, por todas las noches en que estudiamos juntos, por tus palabras de ánimo, por todas esas risas y momentos que compartimos, por tu amistad y amor.

A todos los que lean esta tesis... muchas gracias.

DEDICATORIAS

A mi mamá, mis abuelos Pedro y Elvira, mi Tita, a mi hermano Ángel y a Luis.

Porque todos ustedes aportaron su granito de arena para mi educación y les puedo asegurar que fue cada granito de arena que existe en las playas y desiertos de todo el mundo. Siempre sientan este éxito como suyo. No hay forma en que pueda agradecerles todo el amor y apoyo que me han dado, las facilidades que me brindan para que yo pueda estudiar y la paciencia que me tienen. Muchas gracias por creer en mí, los amo.

Mamá, tú más que nadie me ha apoyado, crees en mí incluso cuando yo no puedo. Me das la fuerza y ese cafecito que necesito para continuar, muchas gracias por las veces que te has desvelado, por todo el tiempo que te dedicas a escucharme, por confiar en mí, pero, sobre todo, por elegir quedarte conmigo, con nosotros.

Angelito, eres todo lo que tengo. Muchas gracias por tu apoyo, tu amor, tus consejos, por hacerme reír, gracias por todas esas veces que te has quedado conmigo hasta tarde mientras termino mi tarea.

Papá Pedro, mamá Cagún, Tita, de no ser por ustedes no sería la persona que soy ahora, muchas gracias por darme un lugar al cual llamar hogar, uno lleno de amor, por regañarme cuando lo creen necesario, por la paciencia que me tienen, no saben cuánto los amo.

Para las personas que miran las estrellas y piensan, por las estrellas que escuchan y los sueños que son respondidos.

*Somos un universo en miniatura,
compuesto por billones de células que trabajan en armonía.
El conocimiento de su estructura y sus procesos
nos revela los secretos de la vida.*

-Albert Einstein

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN	3
MARCO TEÓRICO.....	5
I. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL OVARIO.....	5
II. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO	9
III. ESTEROIDOGENESIS	12
IV. REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESTEROIDOGENESIS.....	14
V. CYP17-HIDROXILASA	16
VI. 17 β -ESTEROIDE DESHIDROGENASA (17 β -HSD)	17
VII. SEROTONINA	18
VIII. BIOSÍNTESIS DE SEROTONINA	18
IX. RECEPTOR A SEROTONINA 5-HT7 (R5-HT7)	20
X. COMPONENTES DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN OVARIO	22
XI. SEROTONINA Y ESTEROIDOGENESIS	23
XII. ANFETAMINAS	25
XIII. ACCIÓN DE P-CLOROANFETAMINA (pCA) SOBRE EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	27
PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN	27
HIPÓTESIS.....	28
OBJETIVO GENERAL	28
OBJETIVOS PARTICULARES.....	28
MATERIAL Y MÉTODO	29
I. PERFUSIÓN	30
II. AUTOPSIA POR DECAPITACIÓN.....	31
III. INCLUSIÓN Y CORTES HISTOLÓGICOS	31
IV. INMUNOHISTOQUÍMICA	31
V. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO	33
VI. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES.....	34
VII. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS	34
VIII. WESTERN BLOT.....	34
IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO	36
RESULTADOS.....	37

DISCUSIÓN DE RESULTADOS	54
CONCLUSIONES	61
BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA.....	64

RESUMEN

La serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT) se sintetiza en el Sistema Nervioso Central (SNC) y en órganos periféricos, como el ovario, donde se expresa el receptor a 5-HT (R5-HT7) entre otros elementos del sistema serotoninérgico. En la gónada la 5-HT estimula la producción de progesterona, testosterona y estradiol. Los derivados de las anfetaminas inhiben el sistema serotoninérgico del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, disminuyen la producción de estradiol e inducen la atresia folicular. Sin embargo, en la rata prepúber se desconoce si la disminución en la producción de estradiol por el ovario es el resultado de las modificaciones en la expresión de las enzimas que regulan la esteroidogénesis y en la expresión de los receptores a serotonina R5-HT7.

Por ello, en el presente estudio se identificó por inmunohistoquímica en el ovario a las proteínas del receptor R5-HT7, y de las enzimas CYP17- Hidroxilasa (CYP17) y 17 β -Hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD). Se evaluó el efecto del inhibidor del sistema serotoninérgico, la p-cloroanfetamina (pCA) en la atresia folicular, así como en la expresión del R-5HT7 y en las enzimas CYP17- Hidroxilasa y 17 β -HSD en el ovario. A ratas hembra de 30 días de edad se les inyectó por vía intraperitoneal 10 mg/kg de p-Cloroanfetamina (pCA) y se autopsiaron a las 48 o 120 h post tratamiento. Como grupo de comparación se utilizaron animales inyectados con solución salina al 0.9% (grupo Vh).

En el ovario de los animales inyectados con pCA se incrementó la atresia en los folículos medianos (200–400 μ m) y preovulatorios (>400 μ m).

El R-5HT7 se expresa en el ovocito y en las células de la granulosa de los folículos pequeños (<200 μ m), medianos (200–400 μ m) y preovulatorios (>400 μ m) independiente al tratamiento con pCA o Vh. La enzima CYP17, se encuentra en el compartimento luteal y en las células de la granulosa. En el grupo Vh, la inmunoreactividad a la enzima CYP17 se incrementó a medida que el folículo alcanza la etapa preovulatoria, mientras que, en los que se les inyectó la pCA, los folículos en sus diferentes etapas de desarrollo presentan inmunoreactividad baja a la enzima.

La inmunoreactividad a la enzima 17 β -HSD se identificó en células de la granulosa de los folículos pequeños (<200 μ m) y medianos (200–400 μ m), en tanto que en los

preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$) las células de la granulosa murales y del cúmulo son positivas a la enzima, tanto en los animales tratados con Vh como con pCA.

La expresión de la enzima CYP17 en el ovario de los animales inyectados con Vh o pCA fue similar a las 48 horas post tratamiento. A las 120 h la expresión de esta enzima disminuyó en los animales inyectados con pCA. La 17β -HSD, no se modificó la expresión de esta enzima en los animales tratados con pCA en comparación con el grupo Vh.

Con base en los resultados se muestra que la inhibición del sistema serotoninérgico del ovario inducido por la pCA induce la atresia folicular y disminuye la expresión de la enzima CYP17.

INTRODUCCIÓN

Los ovarios producen los óvulos y hormonas esteroides sexuales, como el estradiol y la progesterona principalmente (Latarjet & Ruiz, 2019). En el ovario, el desarrollo folicular y la producción de esteroides sexuales es regulado por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, vía la producción de gonadotropinas [Hormona estimulante del folículo (FSH) y Luteinizante (LH)], y por el estradiol, a su vez, este eje es modulado por neurotransmisores, como la 5-HT (Chaudhari *et al.*, 2018).

El ovario no cuenta con inervación serotoninérgica, la fuente de 5-HT son las plaquetas, los mastocitos y la que se sintetiza en las células de la granulosa (Amenta *et al.*, 1992). En la gónada del ratón hembra se identifican marcadores del sistema serotoninérgico, las proteínas que regula su síntesis (triptófano hidroxilasa, TPH), recaptura (proteína transportadora de serotonina, SERT) y degradación (monoamino oxidasa, MAO) y receptores serotoninérgicos (R5-HT7, R5-HT1) (Amireault & Dubé, 2005; Dubé & Amireault, 2007; Nikishin *et al.*, 2018; Nikishin *et al.*, 2019). La 5-HT en el ovario modula la producción de progesterona y estradiol (Koppan *et al.*, 2004; Moran *et al.*, 2013; Gallegos *et al.*, 2022). En otros tejidos, como el hígado o la glándula mamaria, la 5-HT vía el R5-HT7 regula la proliferación celular (Tzirogiannis *et al.*, 2014), evento que también se lleva a cabo durante el desarrollo del folículo ovárico (Hillier, 2001).

Las enzimas CYP17 y la 17 β -HSD regulan la producción de la dehidroepiandrosterona y de la androstenediona, en las células de la teca y de estrona en células de la granulosa, respectivamente. La CYP17 cataliza las actividades de 17 α -hidroxilasa y 17,20 liasa y por lo tanto la conversión de 17 α -pregnenolona a dehidroepiandrosterona y 17 α -progesterona en androstenediona (Gómez *et al.*, 2012). La 17 β -HSD cataliza la transformación de androstenediona a testosterona y de testosterona a estrona (Gupta & Chia, 2013).

Los derivados de las anfetaminas como la pCA, inhiben al sistema serotoninérgico. Se ha observado que en la rata hembra la administración de pCA aumenta la liberación de 5-HT en la hendidura sináptica en las 24h posteriores a su administración, mientras que a largo plazo disminuye la síntesis de 5-HT (Schmidt & Taylor, 1987; Simmler *et al.*, 2018). Cuando a la rata hembra prepúber se le administra pCA, disminuye la concentración de 5-HT en el

hipotálamo, y en el ovario. Esto se acompaña de la disminución en la concentración del estradiol en el suero y el aumento en la atresia folicular (Gallegos *et al.*, 2022).

Por lo anterior, se plantea que la inhibición del sistema serotoninérgico del hipotálamo y del ovario influye negativamente en la esteroidogénesis. Sin embargo, se desconoce si la disminución en la producción de estradiol es el resultado de la modificación en la expresión de las enzimas implicadas en la esteroidogénesis o de la expresión de los receptores de serotonina, el R5-HT7. Por ello, en el presente estudio se analizó el efecto de un inhibidor del sistema serotoninérgico, pCA, en la concentración de progesterona y testosterona en suero, la atresia folicular, la presencia del R-5HT7 y la expresión de las enzimas CYP17, 17 β -HSD en el ovario de la rata prepúber.

MARCO TEÓRICO

I. ESTRUCTURA Y FUNCIÓN DEL OVARIO

El ovario se compone de tres regiones principales, el hilio, la corteza y la médula (Lew, 2019). El hilio es el punto de unión del ovario y el mesovario, las células del hilio se encuentran rodeando a los vasos sanguíneos y a la inervación nerviosa que llega hasta la médula, formada por el tejido conectivo fibroelástico laxo. La corteza presenta una zona exterior denominada túnica albugínea y una zona inferior donde se encuentran los folículos en desarrollo, rodeados por tejido estromal (células intersticiales) (Lew 2019; Rodríguez, 2021).

En el ovario, la formación de los folículos ocurre alrededor de la semana 20 de gestación humana (6 a 7 millones). A medida que se van formando los folículos, se produce la pérdida de ovocitos por apoptosis, de tal forma que, al momento del nacimiento, hay aproximadamente 2 millones de folículos primordiales, que se caracterizan por estar conformados por el ovocito rodeado por una sola capa de 6 a 8 células foliculares aplanadas (Figura 1-A) (Lew, 2019).

En cada ciclo, 20-30 ovocitos primarios (detenidos en diploteno de la profase) reanudan la meiosis, el ovocito aumenta su tamaño y las células foliculares forman un epitelio cúbico; conformando un folículo primario unilaminar (Figura 1-B). Las células foliculares proliferan y forman el epitelio estratificado alrededor del ovocito para constituir el folículo multilaminar o preantral (Figura 1-C); las células que rodean al ovocito reciben el nombre de granulosa, en este punto se forma una membrana basal fuera de las células de la granulosa y una nueva capa de células somáticas, la teca folicular, dividida en compartimientos interno y externo, que encapsula cada folículo. Las células de la teca interna secretan un factor que favorece la formación de los vasos sanguíneos que asegura el aporte sanguíneo necesario para el crecimiento folicular. Entre la granulosa y el ovocito, se forma una capa de glucoproteínas, la zona pelúcida. Estas glucoproteínas son secretadas por el ovocito y las células de la granulosa (Arteaga & García, 2021).

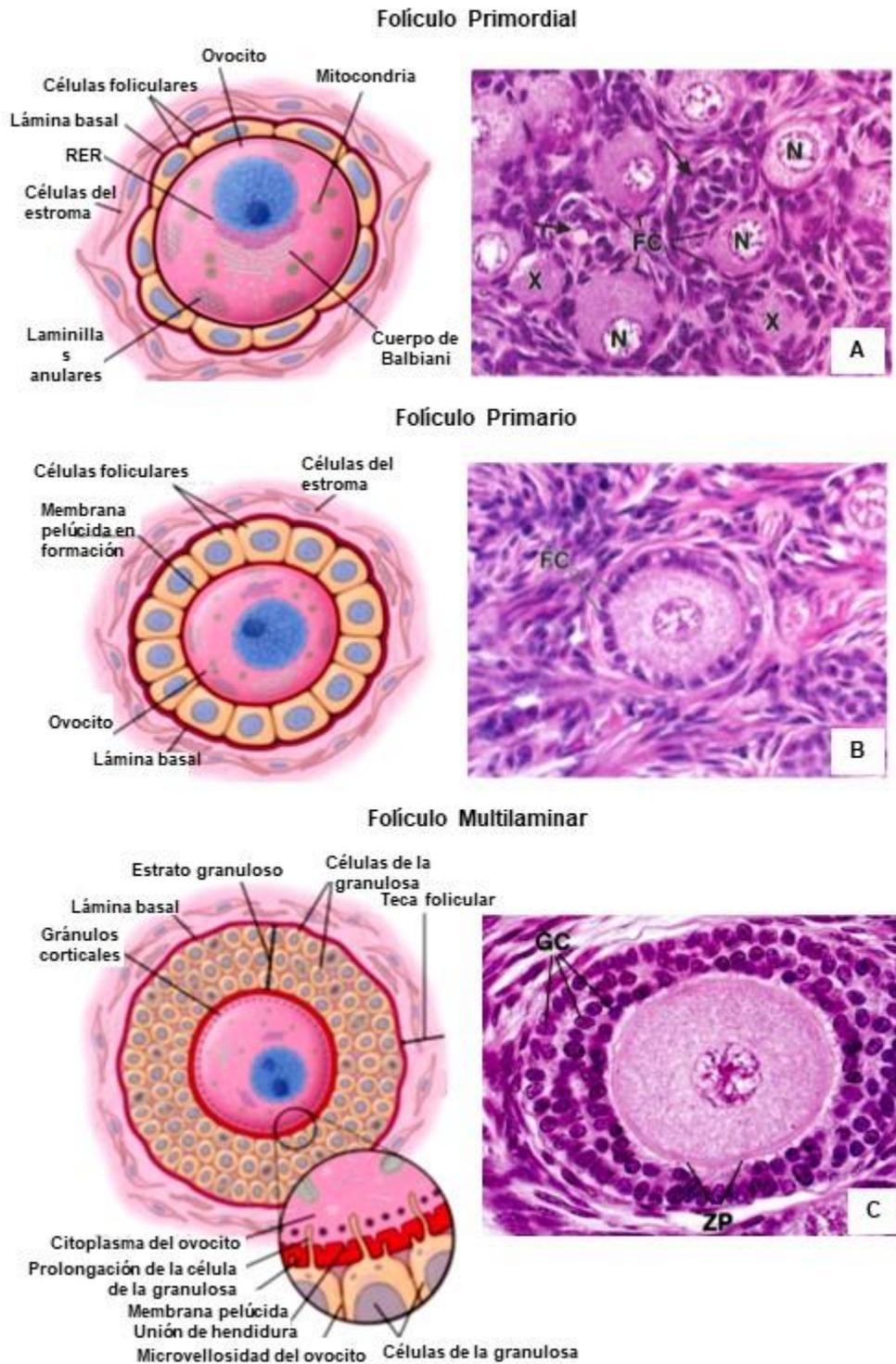


Figura 1. Folículos ováricos en diferentes etapas de desarrollo. A. Primordial; B. Primario; C. Secundario o antral. (N) Núcleo; (FC) Células foliculares; (GC) Células de la granulosa; (A) Antro; (TI) Teca Interna; (TE) Teca Externa; (X) Folículos no visibles a la altura del corte. **Fuente:** Tomado y modificado de Ross & Pawlina, 2015.

A medida que el folículo crece, se acumula líquido folicular en los espacios entre las células de la granulosa, éste termina por formar una cavidad denominada antro y se constituye el folículo antral (Figura 2-A). Formado el antro, las células de la granulosa se dividen en dos poblaciones, las más cercanas al ovocito se denominan cúmulo oóforo, y aquellas que se encuentran delimitando la pared del antro se llaman murales; en esta etapa del desarrollo, el folículo recibe el nombre de preovulatorio o De Graaf (Figura 2-B). Las células del cúmulo ayudan a la maduración del ovocito, mientras que las células murales secretan estrógenos (Ross *et al.*, 2007; Lew, 2019).

El folículo preovulatorio o De Graaf durante la ovulación se rompe y libera el ovocito junto con las células de la granulosa que forman el cúmulo oóforo al oviducto. Las células de la granulosa murales y de la teca se luteinizan, y dan lugar al cuerpo lúteo, cuya función es producir y secretar progesterona, hormona esencial para el establecimiento y mantenimiento de la gestación. El cuerpo lúteo se vasculariza, lo que permite un aporte eficiente de colesterol, de hormonas y nutrientes, así como una secreción hacia la circulación general de progesterona (Gershon & Dekel, 2020). Después de 14 + 2 días, se produce la luteólisis o regresión del cuerpo lúteo y queda reducido a una cicatriz blanquecina denominada corpus albicans (cuerpo blanco) (Sadler, 2019).

Aproximadamente el 99% de los folículos del ovario entra en atresia folicular. Este es un proceso de degeneración de los componentes del folículo que es el resultado de la muerte por apoptosis de las células de la granulosa y del ovocito (Zhou *et al.*, 2019). Los folículos atrésicos pierden su integridad y funcionalidad, presentan cambios morfológicos e histológicos, como; núcleos picnóticos y fragmentación nuclear en las células de la granulosa en el antro del folículo, descamación de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz intercelular, descamación del complejo cúmulo-ovocito y en algunos casos hipertrofia de las células de la teca. También es el resultado de cambios bioquímicos como la reducción en la síntesis del ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células de la granulosa, pérdida de receptores a la gonadotropinas y disminución de la expresión de enzimas esteroideogénicas lo que provoca la disminución de la concentración de estrógenos y el incremento en la concentración de andrógenos (Torres *et al.*, 2008). Los folículos atrésicos comienzan a

expresar endonucleasas y enzimas hidrolíticas en las células de la granulosa, también se puede observar la invasión de neutrófilos y macrófagos (Ross *et al.*, 2015).

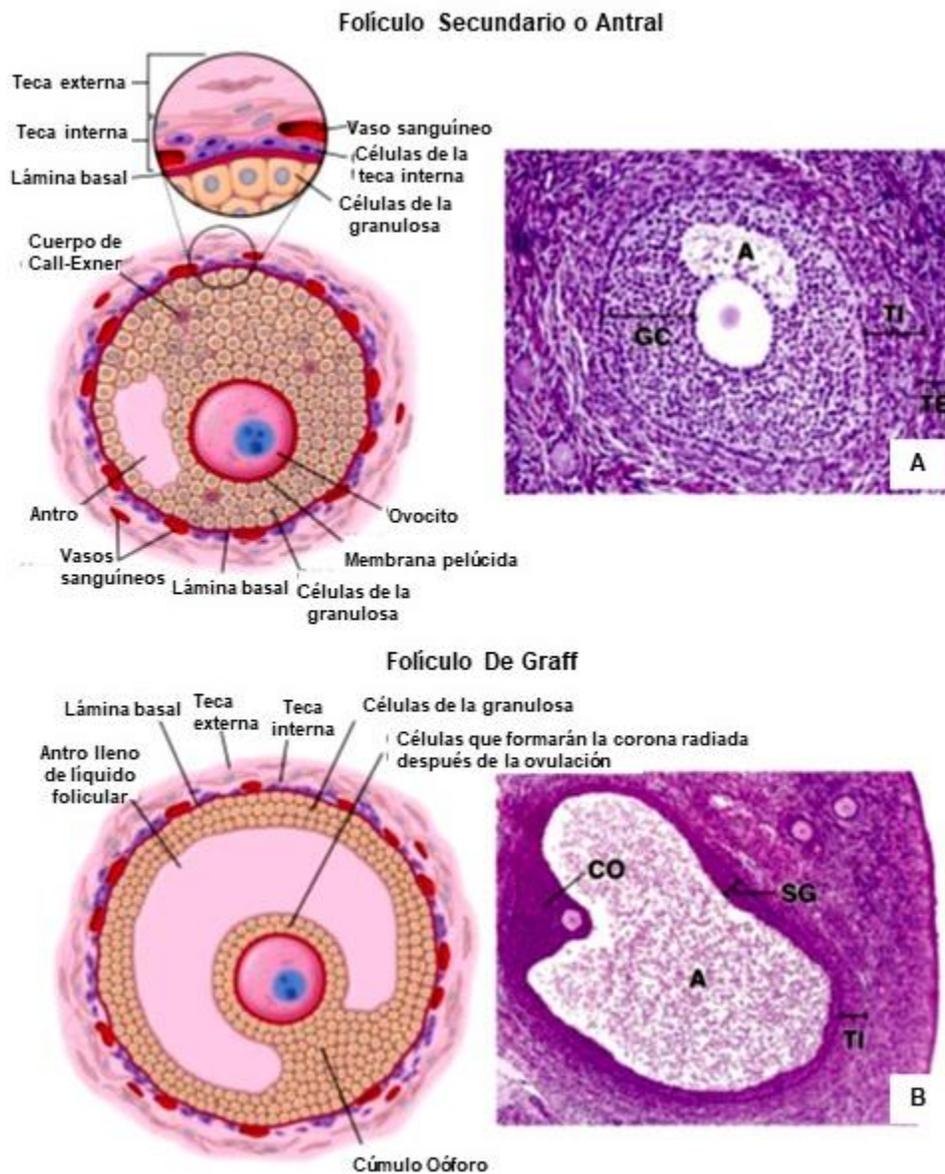


Figura 2. Folículo preovulatorio o De Graff. (SG) Estroma granuloso; (A) Antro; (TI) Teca Interna; (CO) Cúmulo oóforo. **Fuente:** Tomado y modificado de Ross & Pawlina, 2015.

II. EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

El inicio de la etapa puberal se establece cuando el hipotálamo secreta de forma pulsátil la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), esta hormona es secretada por un grupo de neuronas denominada GnRHérgicas, que se ubican en el núcleo arqueado del hipotálamo basal medial y el área preóptica del hipotálamo anterior. La GnRH se transporta vía los vasos porta hipotálamo-hipófisis hasta las células gonadotropas en la adenohipófisis donde estimula la secreción de las gonadotropinas (FSH y LH) y (Figura 3) (Gupta & Chia, 2015; Arteaga & García, 2021).

Las gonadotropinas son glicoproteínas heterodiméricas que constan de una subunidad α y una subunidad β única. La subunidad α es un componente de la FSH, la LH, la hormona estimulante de la tiroides y la gonadotropina coriónica humana. La subunidad β le da la especificidad biológica a cada una de estas hormonas (Ruman *et al.*, 2005). El ovario produce factores de crecimiento como la activina, inhibina y folistatina que modulan la secreción de FSH y la regulación local del desarrollo del folículo (Edson *et al.*, 2009).

El crecimiento de los folículos desde la etapa primordial a la preantral es independiente de la estimulación de las gonadotropinas, pero en folículos antrales, la principal vía de señalización se activa cuando la FSH se une a sus receptores de membrana en las células de la granulosa e interviene en el proceso de reclutamiento folicular, estimula la proliferación celular e induce la aromatización de la androstenediona a estrógenos en los folículos en crecimiento (Lew, 2019; Arteaga & García, 2021). A su vez, la concentración elevada de estrógenos permite el incremento de receptores para FSH y que los folículos continúen desarrollándose en presencia de concentraciones cada vez más bajas de FSH, que determinan la atresia de los otros folículos que no son tan sensibles. La reducción de esta gonadotropina ocurre por el efecto de retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos y la inhibina en el hipotálamo y en la hipófisis (Tresguerres & Castillo, 2005).

Los folículos antrales que expresan una alta concentración de receptores de LH responderán a esta gonadotropina para transformarse en folículos preovulatorios/de Graaf.

La unión de la LH a sus receptores de membrana en las células de la teca favorece la captación de colesterol y su transformación a androstenediona. Las células de la granulosa de los folículos preovulatorios también expresan receptores de la LH y la gonadotropina coriónica humana (hCG) (Filatov *et al.*, 2017). El incremento de LH activa a los folículos De Graaf, generando una secuencia de eventos: 1) la maduración del ovocito (reanudación de la meiosis), 2) mucificación de las células del cúmulo, 3) la ruptura del folículo que culmina en la liberación del complejo cúmulo-ovocito (ovulación) y 4) la luteinización de las células de la teca y de la granulosa para formar el cuerpo lúteo, e incrementa la producción de progesterona (Lew, 2019; Arteaga & García, 2021).

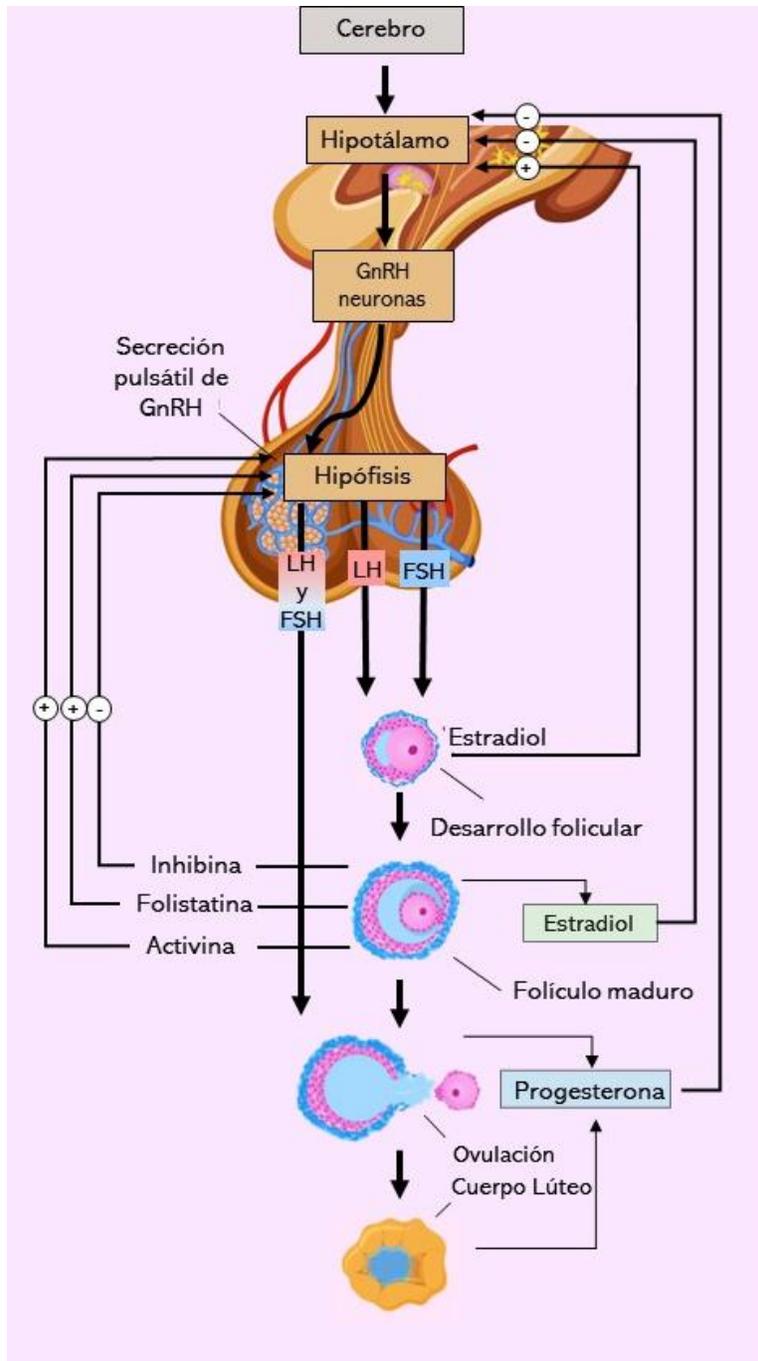


Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. (GnRH) Hormona liberadora de gonadotropinas hipofisarias; (LH) Hormona luteinizante; (FSH) Hormona folículo estimulante. Los folículos antrales secretan hormonas peptídicas como la activina (+) que estimula la secreción de las gonadotropinas o la inhibina y folistatina (-) que inhiben esta secreción. Cuando el folículo produce concentraciones altas de hormonas esteroides (estradiol y progesterona) se produce retroalimentación negativa (-) e inhibe la secreción de GnRH. **Fuente:** Tomado y modificado de Gupta & Chia, 2015; imágenes complementarias: Tomadas de Reproducción Asistida ORG, <https://www.reproduccionasistida.org/>

III. ESTEROIDOGENESIS

Las hormonas esteroides se clasifican en esteroides sexuales (andrógenos, estrógenos y progesterona), glucocorticoides (cortisol) y mineralocorticoides (aldosterona), se sintetizan principalmente en glándulas suprarrenales, gónadas, la placenta y el sistema nervioso central (SNC) (Gómez *et al.*, 2012). Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son el estradiol y la progesterona, también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstenediona y testosterona (Sadler, 2019).

El colesterol (precursor de las hormonas esteroides), se obtiene de las lipoproteínas de baja densidad de la sangre o puede ser sintetizado de *novo* a partir del acetyl-CoA. El colesterol en la célula folicular es transportado desde la membrana externa a la membrana interna de la mitocondria (Miller, 2017) por acción de la proteína reguladora aguda de la esteroidogénesis (StAR, por sus siglas en inglés), que inicia la síntesis de hormonas esteroides sexuales en la gónada (Granot, 2003).

En las células de la teca se expresan receptores a la LH, la unión de la hormona a su receptor inicia la vía Cinasa de proteínas tipo A dependiente del adenosín monofosfato cíclico AMPc/PKA (Gómez *et al.*, 2012). La conversión de colesterol a pregnenolona es catalizada por la enzima P450_{scc} (CYP11A1) de la familia de los citocromos P450. Esta reacción consiste en una reducción del número de carbonos en la que se corta la cadena lateral de 6 carbonos del colesterol (27 C) transformándolo a pregnenolona (21 C) (Bremer 2010; Granot, 2003).

En la ruta Δ^4 -esteroide, la pregnenolona es convertida a progesterona por acción de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD). La progesterona por acción de la enzima, la 17α -Hidroxilasa se transforma en 17OH -progesterona, y finalmente es transformada en androstenediona (Figura 2) (Ventura *et al.*, 2019).

Dentro de la ruta Δ^5 -esteroide, la pregnenolona por acción de la 17α -Hidroxilasa forma 17OH -pregnenolona que a través de $17,20$ liasa es convertida en dehidroepiandrosterona (DHEA), que por actividad de la 3β -HSD, se transforma en androstenediona. Dos isoenzimas de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD), la 17β -HSD1 y 17β -HSD3 produce andrógenos, androstenediona y testosterona (Bremer, 2010; Ventura *et al.*, 2019).

Los andrógenos (androstenediona o testosterona) sintetizados por las células de la teca interna, se difunden a través de la membrana basal hacia las células de la granulosa, donde son convertidos a estrona o 17β -estradiol, respectivamente por la aromatasa P450, que es activada cuando la FSH se une a su receptor de membrana a través de la vía AMPc/PKA (Gómez *et al.*, 2012; Ventura *et al.*, 2019).

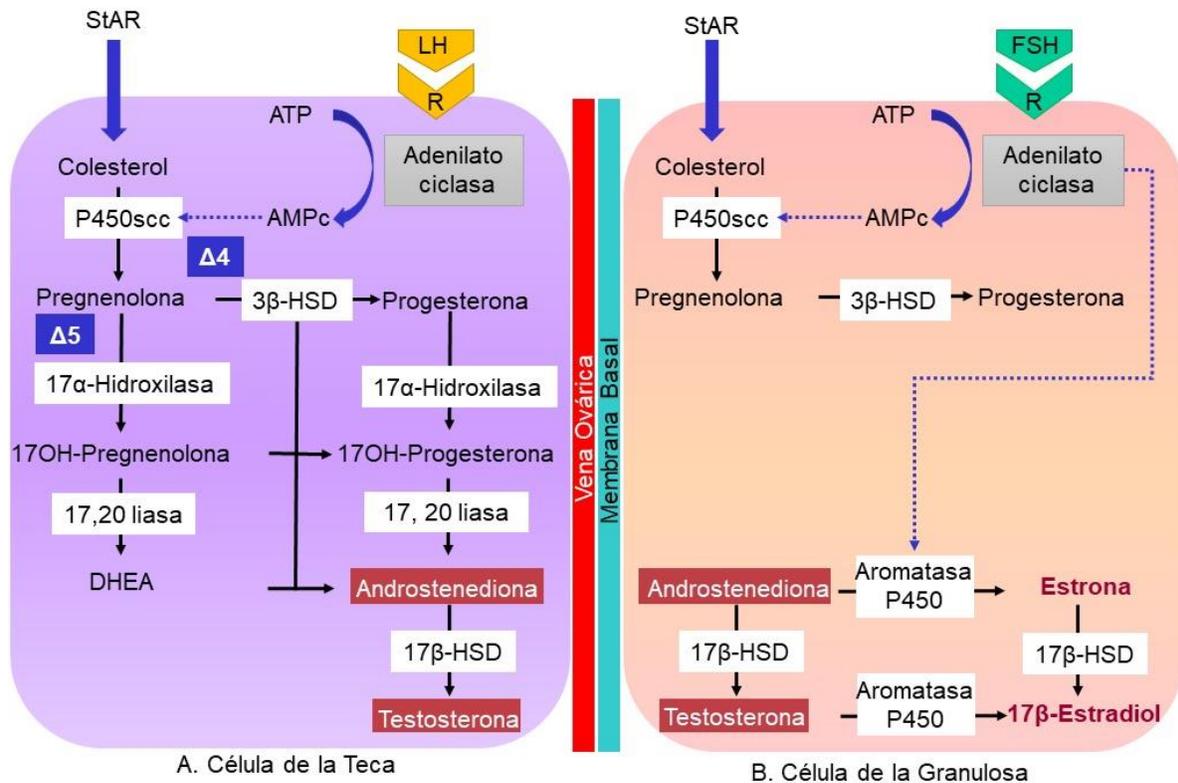


Figura 4. Esteroidogénesis ovárica. Receptor (R), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), adenosín trifosfato (ATP), adenosín monofosfato cíclico (AMPc), 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3βHSD), 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa, Dihidroepiandrostenediona (DHEA). **Fuente:** Modificado de Bremer, 2010.

IV. REGULACIÓN HORMONAL DE LA ESTEROIDOGÉNESIS

La producción de las hormonas esteroides por el ovario es mediada principalmente por la ruta de AMPc/PKA. En las células de la teca se expresan los receptores a LH acoplados a proteínas G. La unión de la hormona a su receptor inicia la síntesis de adenosín monofosfato cíclico (AMPc) a partir de adenosín trifosfato (ATP), que actúa como segundo mensajero y activa la PKA, la que fosforila a la StAR (Figura 5) (Gómez *et al.*, 2012). A su vez, las elevadas concentraciones de AMPc en las células de la teca o de la granulosa, aumenta la actividad de StAR y desencadena la conversión de colesterol a pregnenolona por la CYP11A1. El AMPc regula la expresión y actividad de CYP19 (aromatasa) y CYP17 en las células de la granulosa y la teca, respectivamente, lo que contribuye a la producción de estrógenos y andrógenos (Jamnongjit & Hammes, 2006).

La señalización mediada por Gβγ, se estimula por los receptores acoplados a proteína G y activa la tirosina quinasa Src, que a su vez desencadena la vía Ras/Raf/MEK/MAPK/ERK. La vía de señalización de Src y MAPK inhibe la producción de estrógenos. Cuando a células de la teca del ovario de ratón mantenidas *in vitro* se les adicionan inhibidores de la Src, no se modifica el AMPc, aumenta la actividad del promotor de CYP17 y se estimulan las enzimas, 17α-hidroxilasa y 17,20 liasa, para la producción de androstenediona, pero disminuye la actividad de StAR y la producción de estrógenos (Chaturvedi *et al.*, 2004).

La vía de la fosfolipasa C/inositol 1,4,5-trifosfato (PLC/IP3/) o diacil glicerol (DAG) se activa solo cuando aumenta la secreción de la LH, durante el pico preovulatorio de esta hormona. La activación de la fosfolipasa C (PLC) favorece la diferenciación de las células de la granulosa (Filatov *et al.*, 2017). El trifosfato de inositol (IP3) induce la apertura de los canales de Ca²⁺ del retículo endoplásmico, y como consecuencia incrementa la concentración de Ca²⁺ en el citosol y actúa como un segundo mensajero activando otras cinas e iniciando la cascada de señalización dependientes de Cinasa de proteínas tipo C (PKC), lo que conduce a la activación de las enzimas de la esteroidogénesis (Gómez *et al.*, 2012).

Además de las gonadotropinas, factores intraováricos también mantienen la estructura y función del ovario. Entre estos se encuentran el factor de crecimiento de los fibroblastos (EGF), el similar a la insulina I (IGF-I), el de crecimiento transformante (TGF)- α y β . El IGF-I estimula la proliferación de células de la granulosa y aumenta su actividad aromática, favorece la producción de 17OH-progesterona en las células de la teca; el IGF-I e IGF-II junto con LH inducen la síntesis de andrógenos. Estos factores promueven la proliferación de células de la granulosa, e inhiben la expresión de aromatasa inducida por FSH y la síntesis de estradiol. El TGF- β también estimula la proliferación de células de la granulosa (Filatov *et al.*, 2017).

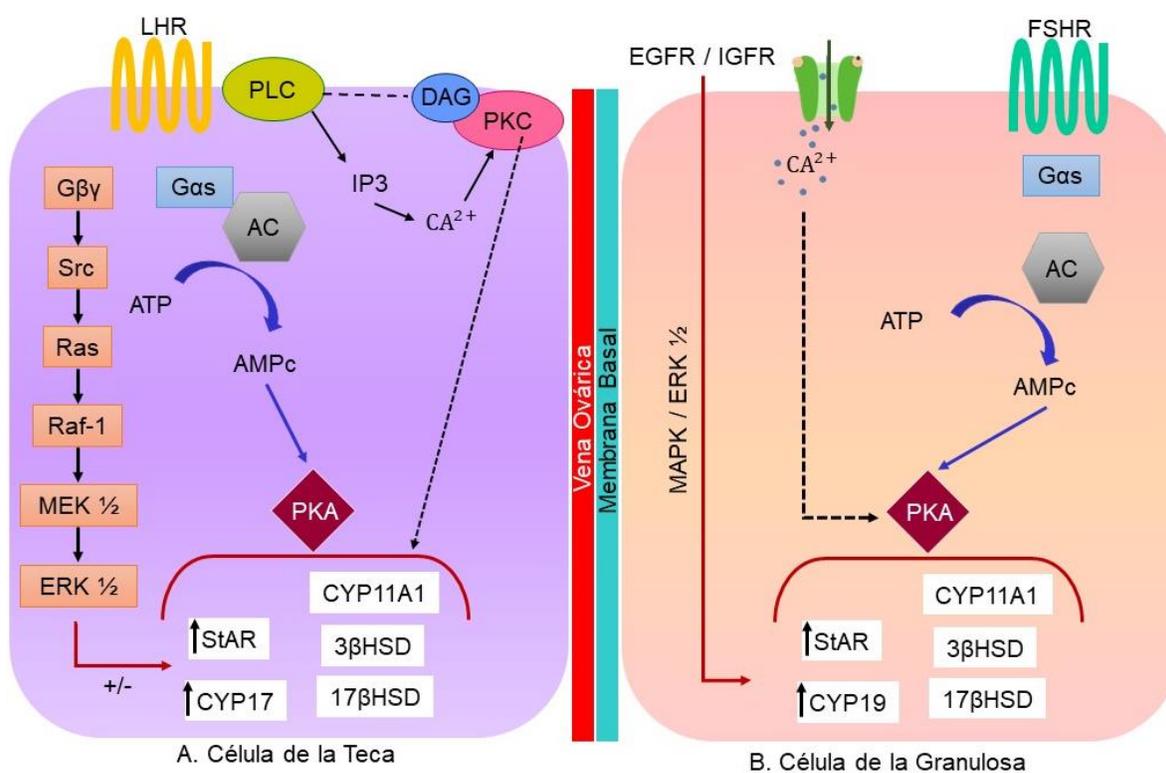


Figura 5. Vías de señalización que regulan la esteroidogénesis. Receptor de la hormona luteinizante (LGR), fosfolipasa C (PLC), diacilglicerol (DAG), cinasas de proteínas tipo C (PKC), trifosfato de inositol (IP3), adenilato ciclasa (AC), adenosín trifosfato (ATP), adenosín monofosfato cíclico (AMPc), cinasas de proteínas de tipo A (PKA), receptor del factor de crecimiento de los fibroblastos (EGFR), receptor del factor de crecimiento similar a insulina I (IGFR), receptor de la hormona folículo estimulante (FSHR), vía de señalización dependiente de proteínas de activación mitogénica (MAPK, ERK 1/2). **Fuente:** Tomado y modificado de Jamnongjit & Hammes, 2006.

V. CYP17-HIDROXILASA

La mayoría de las enzimas de la esteroidogénesis son miembros del grupo citocromo P450 (Miller & Auchus, 2011), se denominan P450 debido a que absorben luz a 450 nm en sus estados reducidos. Los genes de estas enzimas se denominan genes *cyp* (Bremer & Miller, 2014).

La CYP17-hidroxisilasa (P450c17, codificado por el gen *cyp17a1*), se encarga de catalizar actividades de la 17 α -hidroxilasa y la 17,20-liasa, de tal forma que es el principal regulador cualitativo de la esteroidogénesis ya que determina la clase de esteroide que se producirá. Esta enzima se une al retículo endoplásmico liso donde regula la catálisis con electrones de NADPH donados por una flavoproteína llamada oxidorreductasa P450 (POR) (Miller, 2017). La NADPH interactúa con la oxidorreductasa P450 (POR), unida al retículo endoplásmico, y cede un par de electrones, que son recibidos por la fracción FAD (Bremer & Miller, 2014). La reacción de 17 α -hidroxilación requiere un par de electrones y oxígeno molecular. La transferencia de electrones para la 17,20-liasa es promovida por la acción de la hemoproteína citocromo b5 como un factor alostérico en lugar de un electrón alternativo donante y requiere la fosforilación de residuos de serina en CYP17 por una proteína quinasa dependiente de AMPc (Miller, 2017).

En ausencia de CYP17, las células de la teca no producen andrógenos, progesterona, pregnenolona y DHEA (Miller & Auchus, 2011). El tratamiento de ratones con mitotano, inhibidor de la esteroidogénesis, reduce la expresión del a CYP17 y la CYP11A1, la síntesis de andrógenos, lo que se acompaña de la disminución de los folículos antrales. Cuando a estos ratones se les realiza la prueba de ovulación inducida por la administración de gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) o hCG, disminuye el número de ovocitos liberados y de cuerpos lúteos. Cuando las hembras tratadas con el mitotano se ponen a preñar, el número de crías por camada disminuye (Innocenti *et al.*, 2017).

A diferencia de lo anterior, en los modelos de ratón α ERKO se produce la sobreexpresión de esta enzima y se incrementa la producción de androstenediona y testosterona en las células de la teca, lo que inhibe el desarrollo folicular y la ovulación, esto demuestra que los estrógenos derivados de las células de la granulosa modulan la

esteroidogénesis de las células de la teca a través de un ciclo corto de retroalimentación negativa dentro del folículo (Taniguchi *et al.*, 2007).

En modelos de rata con síndrome de ovario poliquístico (SOP), el desarrollo folicular se encuentra detenido y una característica importante es la presencia de un exceso de andrógenos, aunque la LH es el principal factor que induce la expresión de CYP17. Estudios *in vitro* también han revelado que la activina reduce la producción de androstenediona, mientras que la inhibina bloqueó los efectos supresores de la activina añadida, pero aumenta la producción de androstenediona cuando se añadió sola. Lo que sugiere que las hormonas proteicas producidas por las células de la granulosa y el ovocito también regulan la expresión de CYP17 (Young & McNeilly 2012).

VI. 17 β -ESTEROIDE DESHIDROGENASA (17 β -HSD)

Las enzimas HSD tienen masas moleculares de ~ 35 a 45 kDa, no tienen grupos hemo y requieren dinucleótido de nicotina adenina o su fosfato (NADH / NAD + o NADPH / NADP +) como cofactores para reducir u oxidar un esteroide por un mecanismo de transferencia de hidruro (Bremer & Miller, 2014).

La 17 β -HSD, a veces también denominada 17-cetoesteroide reductasa, convierte principalmente la androstenediona en testosterona, la DHEA en androstenediol y la estrona en estradiol (Strauss *et al.*, 2014). En el ovario de rata se expresa exclusivamente en las células de la granulosa de los folículos primarios, secundarios y terciarios sanos. La expresión de esta enzima aumenta conforme el folículo se desarrolla y es más alta en los folículos preovulatorios (Akinola *et al.*, 1997).

En ratas adultas, la administración de ftalato (Li *et al.*, 2020) o cloruro de litio (Jana *et al.*, 2001) disminuye la actividad de la 17 β -HSD, aumenta la atresia folicular, promueve la apoptosis de las células de la granulosa, disminuye la secreción de hormonas sexuales y la expresión de enzimas esteroidogénicas (Li *et al.*, 2020), así como el número de folículos en crecimiento (Jana *et al.*, 2001).

VII. SEROTONINA

En 1948, Maurice Reapport (1919-2011), Arda Green (1899-1958) e Irvine Page (1901-1991) caracterizaron a la serotonina 5-hidroxitriptamina (5-HT), como un factor vasoconstrictor, almacenado en plaquetas, donde participa en la coagulación de la sangre, una función que llevó a su nombre "sero" (del suero) y "tonina" (para inducir la contracción) (McCorvy & Roth, 2015).

Para 1953 Betty Twarong (1927-2013) y Page detectaron 5-HT en cerebros de cobayo y establecieron que al tratarse de una amina biógena compuesta por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino, es de naturaleza hidrófila, y no atraviesa la barrera hematoencefálica, por lo tanto, se sintetiza y actúa como neurotransmisor en el sistema nervioso central (SNC). En 1964 Dahlstrom y Fuxe, mostraron que la inervación serotoninérgica en el SNC se origina en grupos de neuronas cuyos cuerpos se ubican en el núcleo del rafe (Purves, 2016; Hensler, 2012; Díaz *et al.*, 2007). Sin embargo, la producción de 5-HT en el SNC es un pequeño porcentaje del cuerpo (~5%) ya que la mayor parte de 5-HT se encuentra en tejidos periféricos (~95%) (Amireault *et al.*, 2013).

Se han vinculado anomalías de la función de 5-HT en el cerebro con el desarrollo de trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia y la depresión. La 5-HT regula la actividad del SNC, de tejidos y órganos periféricos. En procesos reproductivos vía el eje hipotálamo-hipófisis y al actuar directamente en el ovario (Veselá *et al.*, 2003).

VIII. BIOSÍNTESIS DE SEROTONINA

La 5-HT se forma a partir del aminoácido triptófano que se ingiere en la dieta y se encuentra en concentraciones altas en el chocolate, el huevo, el pescado y el plátano. Este aminoácido es captado por la célula y es oxidado por acción de la triptófano hidroxilasa (TPH), que lo convierte en 5-hidroxitriptófano (5-HTP). Posteriormente, el 5-HTP se descarboxila mediante la acción de L-aminoácido aromático descarboxilasa (LAAD), en 5-hidroxitriptamina (5-HT). En células nerviosas, la 5-HT es liberada a la hendidura sináptica y se une a sus receptores de membrana postsináptica, esta unión genera un mecanismo de retroalimentación negativa y se detiene su liberación. La 5-HT de la hendidura sináptica es

recaptada por la proteína transportadora de serotonina (SERT) y se almacena en vesículas para protegerla de su degradación por enzimas intracelulares. La 5-HT es degradada mediante una desaminación oxidativa catalizada por la monoamino oxidasa (MAO), seguida de un proceso oxidativo por acción de la enzima aldehído deshidrogenasa para convertirse en ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Figura 3) (Dubé & Amireault, 2007; Hensler, 2012).

Se han identificado dos isoformas de la TPH en humanos y otros mamíferos, la TPH1 y TPH2. La primera regula la síntesis de 5-HT en tejidos periféricos, principalmente en las células enterocromafines del tubo digestivo y en menor proporción en las plaquetas, mientras que TPH2 se le encuentra en el SNC (Walther *et al.*, 2003).

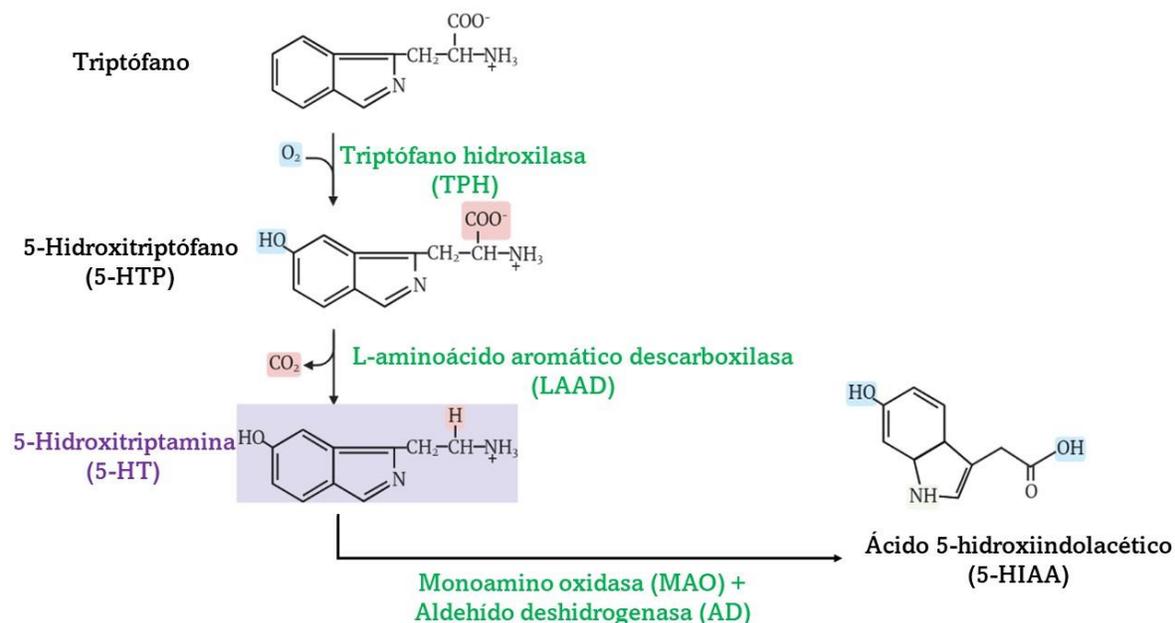


Figura 6. Biosíntesis de serotonina. **Fuente:** Elaboración propia con BioRender.

IX. RECEPTOR A SEROTONINA 5-HT7 (R5-HT7)

Los receptores a 5-HT, comparten similitudes en su secuencia de aminoácidos, propiedades farmacológicas y mecanismos de señalización. Se conocen 14 subtipos de receptores codificados genéticamente, que se agrupan en siete familias (5-HT1 a 5-HT7). Se acoplan a proteínas G con siete dominios transmembranales, a excepción del 5-HT3, que es un canal iónico acoplado a un canal iónico (Pawluski *et al.*, 2019). Los receptores de la familia 5-HT1 promueven la disminución de AMPc, mientras que la familia 5-HT4, 5-HT6 y 5-HT7 inducen el aumento de AMPc. Los receptores 5-HT2 aumentan el Ca²⁺ al activar la vía de la hidrólisis PI(4,5)P2 (fosfatidil-inositol bis-fosfato) (Raymond *et al.*, 2001; Amireault & Dubé, 2005).

El receptor R5-HT7, el último receptor de 5-HT que se descubrió en 1993, es un polipéptido de 448 aminoácidos, el gen que codifica para este receptor se encuentra en el cromosoma 10 (Di Pilato *et al.*, 2014). En el cerebro el R5-HT7 se expresa en neuronas, astrocitos y microglía (Guseva *et al.*, 2014). La unión de la 5-HT al receptor en diferentes regiones del cerebro se le asocia a la regulación de epilepsia y sueño (tálamo); ritmos circadianos, termorregulación, estrés y secreción de factores liberadores (hipotálamo); memoria y aprendizaje (hipocampo); reacciones emocionales y motivación (amígdala); ánimo, cognición y sueño (corteza). También regula la proliferación y diferenciación celular y se le asocia con patologías como la ansiedad, depresión y esquizofrenia (Thomas *et al.*, 2002; Martin-Cora *et al.*, 2004; Di Pilato *et al.*, 2014).

El R5-HT7 también se expresa en tejidos y órganos periféricos, como el tracto digestivo, la aorta, el hígado, la glándula mamaria, adrenales y las gónadas (Lenglet *et al.*, 2000; Amireault & Dubé, 2007; Tzirogiannis *et al.*, 2014; Pai *et al.*, 2015; Quintero-Villegas & Valdés, 2019).

En glándula mamaria la unión de la 5-HT al R5-HT7 mantiene su función secretora, debido a que estimula la proliferación y diferenciación celular del epitelio alveolar (Cinar *et al.*, 2022). El desarrollo de la glándula comprende ondas de proliferación y regresión asociados con la preñez, lactación e involución de las células lumbinales. Durante la preñez, las células del epitelio alveolar proliferan y se diferencian para la producción de leche durante la lactación. En el epitelio alveolar se produce la apoptosis masiva durante la involución. Los

eventos de diferenciación y proliferación son regulados por la activación del R5-HT7. En apoyo a esto, en el modelo del ratón *Knockout* para este receptor, el epitelio mamario presenta células multinucleadas y pocas vesículas secretoras de leche. Además, no se produce la transición de la lactancia a la involución (Pai *et al.*, 2015).

En el hígado, la unión de la 5-HT al R5-HT7 también está implicada en la regulación de la proliferación de los hepatocitos, Tzirogiannis y colaboradores (2014), observaron que, en ratas adultas con hepatectomía parcial, la administración del inhibidor del R5-HT7, clorhidrato de SB-269970, disminuye la proliferación celular y como consecuencia la regeneración del tejido hepático (Tzirogiannis *et al.*, 2014).

En la zona glomerular de la corteza suprarrenal de la rata, la activación de los R5-HT7 estimula la secreción del esteroide aldosterona y en la zona reticular de esteroides sexuales (Lenglet *et al.*, 2000).

Este receptor se ha implicado en la regulación de la esteroidogénesis, cuya vía de señalización incluye la activación de la adenilato ciclasa y la formación del segundo mensajero, AMPc. En células de la granulosa luteinizadas de mujer, la adición al medio de cultivo de 5-HT incrementa la producción del AMPc y de progesterona. Cuando al medio se le agrega el antagonista de los receptores R5-HT7, la mianserina, disminuye la producción de AMPc estimulada por 5-HT. Lo anterior llevó a proponer que la unión de la 5-HT a su receptor 7 estimula la esteroidogénesis en el folículo ovárico (Graveleau *et al.*, 2000).

X. COMPONENTES DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN OVARIO

Además del SNC, la 5-HT se encuentra en los oviductos, el útero, ovarios y líquido folicular de ratas, hámsteres y ratones (Dubé & Amireault, 2007). La fuente de 5-HT del ovario son las plaquetas, mastocitos infiltrados y la síntesis *de novo* se lleva a cabo en las células de la granulosa (Amenta *et al.*, 1992; Amierault & Dubé, 2005).

En el ratón, la presencia de TPH1 en las células de la granulosa del cúmulo (Dubé & Amireault, 2007), de la TPH2 presente en ovocitos de folículos con varias capas de células de la granulosa y embriones de 2 células (Basu *et al.*, 2008) y la presencia de la LAAD en tejido intersticial, sustentan que en el ovario se sintetiza 5-HT como resultado de la cooperación de los diferentes tipos celulares del órgano (Nikishin *et al.*, 2018).

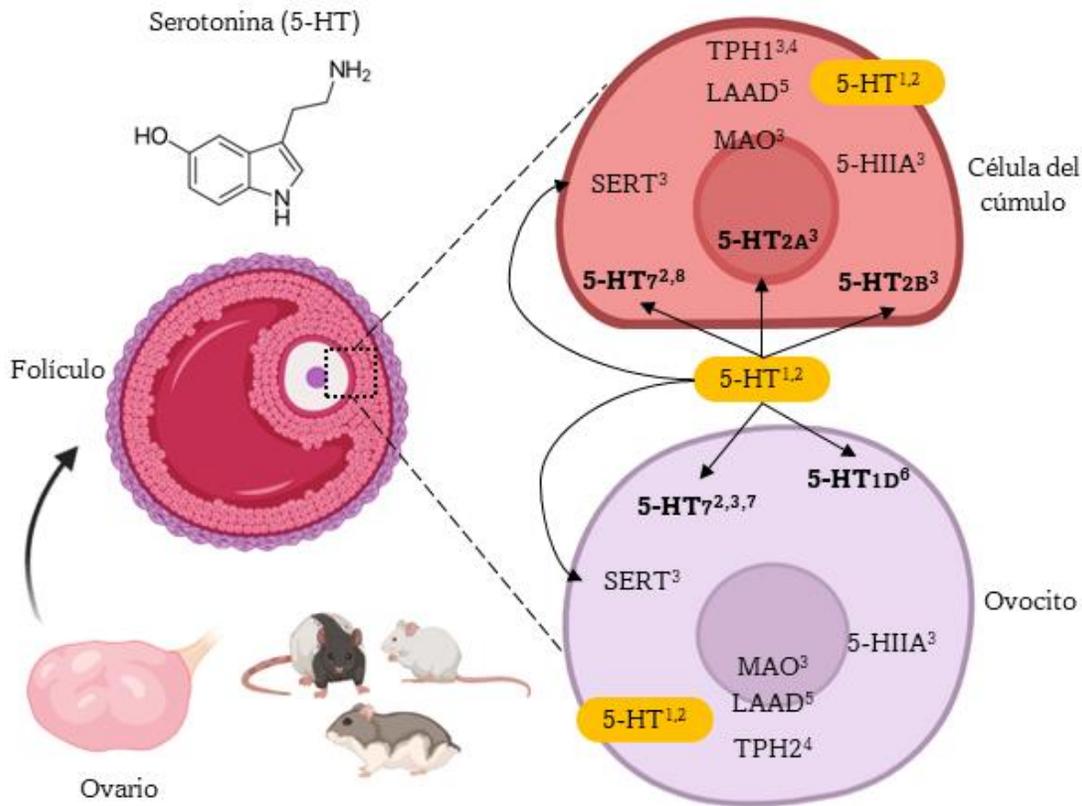


Figura 7. Marcadores del sistema serotoninérgico en el ovario. (5-HT) Serotonina, (HTP) Triptófano hidroxilasa, (LAAD) L-amino aromático descarboxilasa, (MAO) Monoamino oxidasa, (SERT) Transportador específico de serotonina. 1. Clausell y Sullivan, 1978; 2. Gallegos *et al.*, 2022; 3. Amierault y Dubé, 2005; 4. Nikishin *et al.*, 2018; 5. Nikishin *et al.*, 2019; 6. Veselá *et al.*, 2003; 7. Gravelau *et al.*, 2000. **Fuente:** Elaboración propia con BioRender.

La proteína transportadora de 5-HT (SERT), también se ha identificado en ovocitos, en células de la granulosa del cúmulo y en embriones tempranos de ratón (Amireault & Dubé, 2005). Esta proteína es esencial en el sistema serotoninérgico, ya que garantiza la eliminación de 5-HT extracelular debido a que la incorpora a la célula que la liberó para su posterior reciclaje o degradación por acción de la MAO y la producción de su metabolito 5-HIAA.

La idea de que la 5-HT ovárica actúa en el órgano modulando sus funciones se sustenta en las evidencias que muestran la presencia de los receptores 5-HT 2A, 5-HT 2B y 5-HT 7 en células de la granulosa de ratón (Neilson *et al.*, 2000; Amireault & Dubé, 2005) y los receptores 5-HT 1D y 5-HT7 en rata y ratón (Gravelau *et al.*, 2000; Veselá *et al.*, 2003; Gallegos *et al.*, 2022).

XI. SEROTONINA Y ESTEROIDOGÉNESIS

La 5-HT estimula la esteroidogénesis en las gónadas de humanos (Koppan *et al.*, 2004), de la rata (Tanaka *et al.*, 1993) y hámsteres (Terranova *et al.*, 1990).

En la rata hembra prepúber de 30 días de edad, la administración sistémica de 5-HT o en la bursa del ovario (Moran *et al.*, 2012), así como la adición de 5-HT al cultivo de folículos preovulatorios de rata hembra adulta en proestro (Tanaka *et al.*, 1993), incrementa la producción de estradiol. Un efecto similar se observa a los 60 o 120 minutos después de que se administra el precursor de la 5-HT, 5-HTP, por vía sistémica o directamente en la bursa del ovario. El incremento en la producción de estradiol se acompañó del aumento en la concentración de 5-HT en el hipotálamo y en el ovario. Cuando en la rata hembra prepúber de 30 días de edad se le inyecta un inhibidor del sistema serotoninérgico del hipotálamo y del ovario, por la administración de la p-CA, disminuye la concentración de estradiol en el suero y la 5-HT en el hipotálamo anterior y medio y en (el ovario Gallegos *et al.*, 2022).

El efecto estimulante de la 5-HT en la secreción de hormonas esteroides, también se ha observado en la mujer y en otros organismos. En células de la granulosa en cultivo y obtenidas de los folículos de mujeres sometidas a un tratamiento de estimulación hormonal en su preparación para la fertilización *in vitro*, se observó que la adición de 5-HT, LH o FSH al medio de cultivo aumenta la secreción de estradiol y progesterona, mientras que la

coadministración de 5-HT con una u otra gonadotropina aumenta aún más la producción de estradiol (Koppan *et al.*, 2004).

En la yegua, las concentraciones intrafoliculares de 5-HT, estradiol y progesterona son más altas en comparación con las sistémicas. La amina está presente en los folículos en diferentes etapas de desarrollo y su concentración aumenta en los folículos preovulatorios cuya capacidad de síntesis de estradiol es mayor (Satué *et al.*, 2019). Conjuntamente estas evidencias muestran que la 5-HT regula la producción de hormonas esteroides por el ovario.

Los efectos de la 5-HT en la producción de esteroides dependen del receptor a 5-HT que se active (Terranova *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1993; Gravelleau *et al.*, 2000). Cuando se mantienen folículos preovulatorios de hámster en proestro y se le adiciona al medio 5-HT se incrementa la producción de estradiol, mientras que la adición de un antagonista de los receptores R5-HT1 y R5-HT2, mianserina, no se produce el incremento en la secreción de estradiol, cuando se adiciona el antagonista de los receptores a R5-HT2, no se afecta la producción del estradiol inducida por 5-HT. Lo anterior llevó a los autores a proponer que el efecto de la 5-HT en la producción de estradiol, es mediado por su unión al R5-HT1 (Terranova *et al.*, 1990). Tanaka y colaboradores (1993), observaron un efecto diferente cuando a la rata hembra en proestro se le administra por vía oral ketanserina, ya que disminuye la concentración de estradiol. Cuando se mantienen los folículos preovulatorios *in vitro* y se le adiciona al medio 5-HT más ketanserina disminuye la producción de progesterona, testosterona y estradiol. La adición al medio de pregnenolona o progesterona incrementa la secreción de progesterona o testosterona y estradiol, respectivamente.

XII. ANFETAMINAS

A pesar de que en 1887 se sintetizó por primera vez la anfetamina por L. Edelano, fue hasta 1920 que Gordon Alles descubrió que el sulfato de anfetamina y el sulfato dextro anfetamínico, poseían la capacidad de estimular al SNC. Las anfetaminas y sus derivados son drogas adictivas, que dañan al organismo y a la salud (Müller & Hombergb, 2015). Estimulan al organismo en general; mejoran el rendimiento intelectual y la ejecución de tareas manuales; pero disminuyen el cansancio, el sueño y el hambre (Robledo, 2008). Estas sustancias modifican la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión. Las drogas recreativas como; la cocaína, anfetamina (AMPH), metanfetamina (METH) o 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA, éxtasis), inducen desregulación de la actividad extracelular de la 5-HT (Szigeti *et al.*, 2018).

La \pm 3,4-metilendioximetanfetamina (MDMA) es un estimulante empatogénico que es el componente principal de las pastillas de éxtasis. El consumo de MDMA/éxtasis prevalece entre los jóvenes de entre 15 y 34 años (Szigeti *et al.*, 2018). La MDMA aumenta la actividad extracelular de 5-HT en los núcleos del rafe, el cuerpo estriado, sustancia negra, el tálamo y el hipocampo de cerebros de rata y ratón. En general, la administración aguda de la MDMA tiene un fuerte efecto potenciador sobre la actividad extracelular de la 5-HT. El tratamiento crónico disminuye la función de la SERT en algunas, pero no en todas las áreas del cerebro y disminuye las concentraciones tisulares de 5-HT (Müller & Hombergb, 2015).

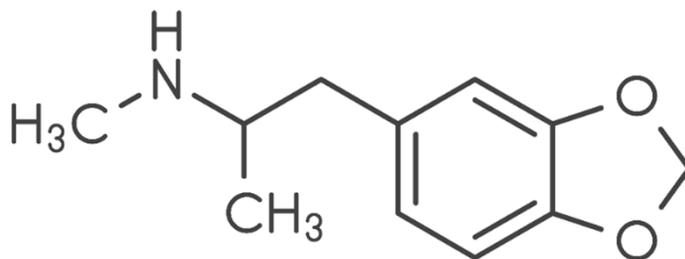


Figura 8. Estructura química del MDMA. **Fuente:** Tomado de *Library.neura.edu.au*.

XIII. ACCIÓN DE P-CLOROANFETAMINA (pCA) SOBRE EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO

Un análogo de la amfetamina es la pCA, selectiva para 5-HT. La pCA induce el síndrome conductual característico de 5-HT, como el movimiento de la cabeza, el pisado de las patas delanteras y la abducción de las patas traseras en ratas (Sugimoto *et al.*, 2000). A nivel molecular actúa sobre la SERT. Al bloquear el transportador, se evita la recaptación de 5-HT, que en un primer paso aumenta la concentración del neurotransmisor en la hendidura sináptica (Sprague *et al.*, 1996; Kehr *et al.*, 2011; Simmler *et al.*, 2018). Posteriormente conduce a la inhibición de la TPH y de la MAO, y finalmente estos eventos provocan la disminución de la concentración de 5-HT y 5-HIAA (Schmidt y Taylor, 1987; Simmler *et al.*, 2018) (Figura 9).

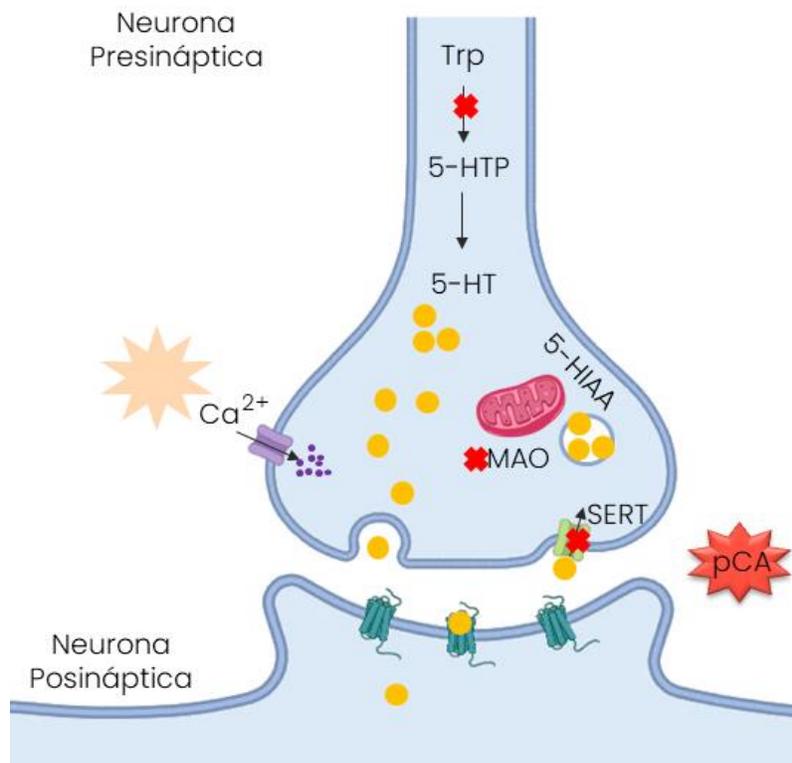


Figura 9. Mecanismo de acción de la p-cloroanfetamina (pCA) sobre el sistema serotoninérgico. (Trp) Triptófano, (5-HTP) 5-Hidroxitriptófano (5-HT) Serotonina, (MAO) Monoamino oxidasa, (5-HIAA) Ácido 5-hidroxiindolacético, (SERT) Transportador específico de serotonina. **Fuente:** Elaborado con BioRender.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La 5-HT en el ovario estimula la producción de progesterona y estradiol, esenciales en el desarrollo folicular. En otros tejidos, la 5-HT vía su unión al R5-HT7 estimula la proliferación celular, evento esencial para el crecimiento del folículo. Los derivados de las anfetaminas producen la desregulación del sistema serotoninérgico. Por lo anterior, en el presente estudio se analizó el efecto de la inhibición del sistema serotoninérgico inducido por la administración de la pCA, en la concentración en suero de progesterona y testosterona; atresia folicular; expresión del R5-HT7 y las enzimas de la esteroidogénesis en el ovario de la rata prepúber, etapa en la que el uso de los derivados de las anfetaminas puede afectar de forma negativa los procesos previos a la madurez sexual.

PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

La inhibición del sistema serotoninérgico del ovario, ¿induce atresia folicular?, ¿modifica la presencia del R-5HT7 y la expresión de las enzimas CYP17 y 17 β -HSD que participan en la esteroidogénesis ovárica?

HIPÓTESIS

Dado que la 5-HT estimula la esteroidogénesis ovárica, la disminución de ésta por la administración del inhibidor del sistema serotoninérgico, pCA, modificará el desarrollo folicular, la esteroidogénesis, la expresión del R-5HT7, CYP17, y 17 β -HSD en el ovario de la rata prepúber.

OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la inhibición del sistema serotoninérgico en la atresia folicular, concentración de progesterona y testosterona en suero, presencia del R-5HT7 y la expresión de las enzimas, CYP17 y 17 β -HSD en el ovario de la rata prepúber.

OBJETIVOS PARTICULARES

- ❖ Analizar los efectos de la pCA en el desarrollo y atresia folicular de los ovarios de la rata prepúber.
- ❖ Evaluar los efectos de la administración de pCA en la concentración de progesterona y testosterona en el suero de la rata prepúber.
- ❖ Identificar los sitios de expresión del R-5HT7 y de las enzimas CYP17-Hidroxilas y 17 β -HSD en el ovario de la rata prepúber.
- ❖ Evaluar los efectos de la pCA sobre la expresión de las enzimas CYP17-Hidroxilasa, y 17 β -HSD en el ovario de la rata prepúber.

MATERIAL Y MÉTODO

Para realizar este estudio se utilizaron ratas hembra de 30 días de edad de la cepa CII-ZV, que fueron mantenidas en periodos de 14h luz-10 h oscuridad, con libre acceso a la madre hasta el destete y posteriormente al agua y al alimento, siguiendo lo establecido por la Ley Mexicana de Protección de Animales de Experimentación (NOM-062-ZOO-1999).

Se distribuyeron en grupos experimentales de ocho individuos. El testigo absoluto (TA) no se sometió a ningún tratamiento. Los animales del grupo vehículo (Vh), fueron inyectados con solución salina al 0.9% y un grupo fue tratado con p-cloroanfetamina (pCA) (Merck, Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) en una dosis de 10 mg/Kg de peso corporal. En todos los casos, la administración del fármaco y la solución salina se realizó vía intraperitoneal en un horario de 8:30 a 9:30 h.

De cada grupo experimental (n=8), se realizó la perfusión de tres ratas y cinco se autopsiaron por decapitación, a las 48 o 120 horas postratamiento. En ambos casos, se extrajo el ovario izquierdo y el derecho. En el ovario izquierdo de los animales perfundidos se realizó la técnica de inmunohistoquímica para identificar el receptor 5-HT7 (R5HT7) y las enzimas CYP17-hidroxilasa, y 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β -HSD), mientras que con el ovario derecho de los animales autopsiados por decapitación se llevó a cabo la cuantificación de las enzimas antes mencionadas mediante Western Blot (Figura 10).

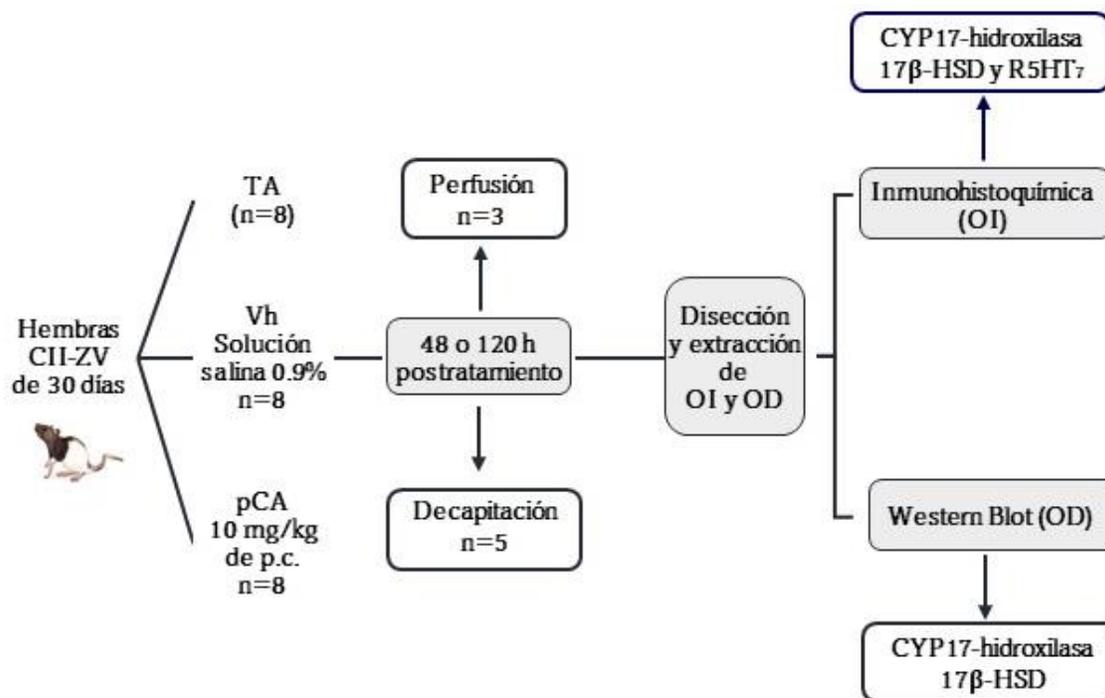


Figura 10. Grupos experimentales y tratamiento. (TA) Testigo absoluto, (Vh) vehículo, (pCA) p-Cloroanfetamina, (OI) ovario izquierdo, (OD) ovario derecho. **Fuente:** Elaborado con BioRender.

I. PERFUSIÓN

Los animales se anestesiaron con 40 mg/kg de pentobarbital (Smith Kline Norden, México Monterrey, N.L.). Los animales se colocaron en posición dorsal y se realizó un corte longitudinal para separar piel y músculo de la región de la caja torácica hasta exteriorizar el corazón. En el ventrículo izquierdo se insertó una aguja acoplada a una bomba de flujo variable (Mini-pump variable flow, Control Company USA). Se inició el bombeo con 150 mL de solución salina al 0.9 %. Al inicio de la perfusión se hizo un corte en la aurícula derecha para permitir el flujo de sangre y la solución salina. Posteriormente se administraron 150 mL de fijador, paraformaldehído al 4% (Merck, Sigma - Aldrich, St. Louis, USA). Ambas soluciones se perfundieron a una velocidad de 8 mL/min. Al término de la perfusión, se disecaron ambos ovarios, izquierdo y derecho y se post-fijaron por inmersión en paraformaldehído 4% durante 24 horas. Posteriormente, se colocaron durante 48 horas en sacarosa 15% (J.T. Baker) y finalmente en alcohol 70% (J.T. Baker) hasta realizar la técnica de inmunohistoquímica.

II. AUTOPSIA POR DECAPITACIÓN

Cinco animales de cada grupo experimentales se autopsiaron por decapitación entre las 9:00 a 11:00 h. Se cortó piel y músculo de la región pélvica para visualizar el aparato reproductor. Se extrajeron los ovarios izquierdos y derecho y se almacenaron en tubos eppendorf a -70° C, hasta la cuantificación enzimática de CYP17-hidroxilasa y 17β -HSD mediante Western Blot.

III. INCLUSIÓN Y CORTES HISTOLÓGICOS

Los ovarios izquierdos obtenidos de los animales perfundidos se sometieron a un tren de deshidratación: alcohol 70° , 80° , 96° , 100° y alcohol: xilol (1:1) durante 75 minutos cada cambio, finalmente se colocaron en xilol durante 1 minuto, posteriormente se incluyeron en paraplast líquido (Surgipath, Leica, USA), durante 1h a una temperatura de $55-58^{\circ}$ C. Se realizaron bloques de paraplast (Surgipath, Leica, USA), los cuales fueron tallados para eliminar el exceso de paraplast, y se realizaron cortes de $7\ \mu\text{m}$, con un micrótopo (Spenser 820, American Optical, USA). La colecta de los cortes se realizó cada 100 μm , se montaron seis cortes por portaobjetos cargados con poli-L-lisina (Merck, Sigma - Aldrich, St. Louis, USA).

IV. INMUNOHISTOQUÍMICA

Los cortes de ovario se desparafinaron e hidrataron, posteriormente se realizó la recuperación antigénica, para el bloqueo de la peroxidasa endógena se utilizó peróxido de hidrógeno al 0.3% (J.T. Baker, USA). Los cortes se incubaron con el anticuerpo primario [Receptor 7 de 5-HT (R-5HT7 Abcam, ab128892, Cambridge, Reino Unido); 17α -hidroxilasa (CYP17A1 Abcam, ab231914, Cambridge, Reino Unido) y 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD Abcam, ab97975, Cambridge, Reino Unido)] durante toda la noche a 4° C y posteriormente con el anticuerpo secundario [Anti-Mouse (Sta. Cruz, #7076, Cell Signaling Technology), Anti-Rabbit (Sta. Cruz, #7074, Cell Signaling Technology)] durante 45 minutos a TA (temperatura ambiente). Para el revelado se empleó diaminobencidina (DAB) (Vector, Inc. Burlingame, CA, USA) y se realizó la contraincubación con hematoxilina de Harris. Finalmente se montaron con Permount (CTR, USA). Con ayuda de un microscopio (NIKON OPTIPHOT-2) se identificaron las células positivas (células

teñidas de color marrón) al R5-HT7 y las enzimas, CYP17-hidroxilasa y 17 β -HSD en los componentes del ovario (folículos) (Figura 11).

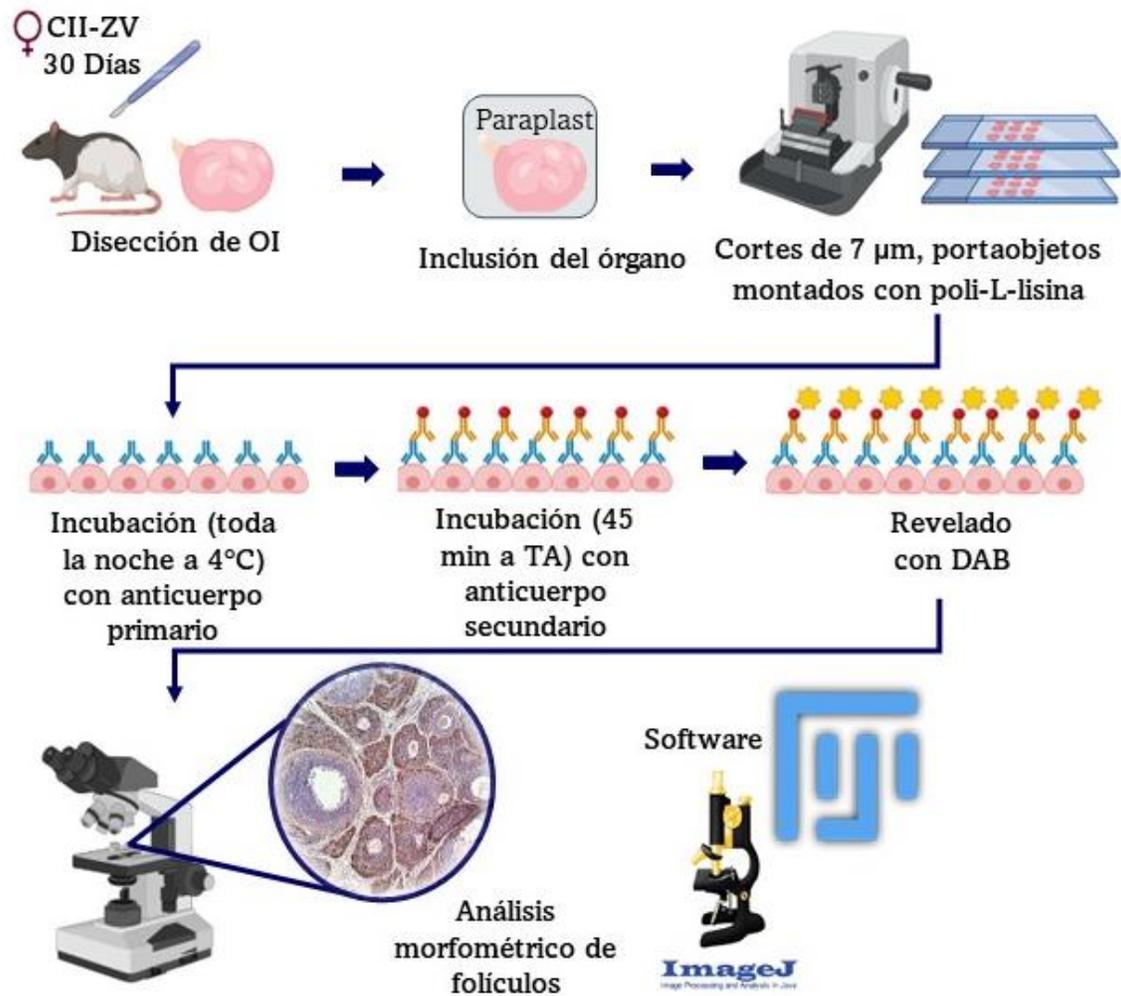
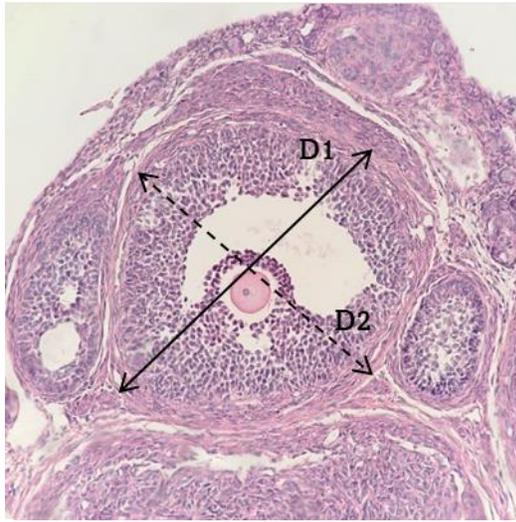


Figura 11. Técnica de Inmunohistoquímica. OI, ovario izquierdo; TA, temperatura ambiente; DAB, diaminobencidina. **Fuente:** Elaboración propia con BioRender.

V. ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Se tomaron micrografías a 20x, con una cámara móvil de 12 megapíxeles (iPhone SE, A1723), adaptada a un microscopio con contraste de fases (NIKON OPTIPHOT-2) y se procesaron en el programa Imagej (Versión 1.53b, National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA), para calcular el diámetro promedio (DP), se tomaron las medidas del diámetro mayor (D1) y su perpendicular (D2). Con estos dos valores se realizó el cálculo del DP con la siguiente relación:



$$\frac{D1+D2}{2}=DP$$

Figura 12. Esquema de las medidas del diámetro promedio (DP). Diámetro mayor (D1) y su perpendicular (D2).

De acuerdo con el DP, los folículos se agruparon en folículos pequeños (<200 μm), medianos (200-400 μm) y preovulatorios (>400 μm) (Gallegos *et al.*, 2022).

Los folículos se clasificaron en: Marca baja (10 células positivas) moderada (11-20 células positivas) o intensa (>21 células positivas).

Como criterios de atresia se consideraron los cambios en la morfología del folículo como: 1) alteración del ovocito, 2) descamación de las células de la granulosa, 3) picnosis en células de la granulosa y 4) engrosamiento de la teca (Torres *et al.*, 2008).

VI. CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

De los animales autopsiados por decapitación se colectó la sangre en tubos de ensayo, se centrifugó por 15 min. a 3500 rpm y se recuperó el sobrenadante (suero). Las concentraciones séricas de progesterona y testosterona se midieron mediante radioinmunoensayo de fase sólida, se utilizó un kit Coat-A-countcon (Diagnostic Products, Los Angeles, USA). Los coeficientes de variación intra e interensayo para testosterona fueron 4.3 y 7.8%, para estradiol 7.2 y 8.5%, respectivamente. Las concentración de progesterona y testosterona se expresaron en ng/ml.

VII. EXTRACCIÓN Y CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS

A las muestras de OD contenidas en tubos eppendorf, se les agregó un buffer de lisis RIPA (Sigma-Aldrich, MO, CA, USA) en una relación de 1 mL de buffer por 100mg de tejido, se homogeneizaron por sonicación y se centrifugaron por 2 min. a 10,000 rpm a una temperatura de 5°C. Posteriormente se recuperó el sobrenadante para obtener la proteína total, por el método de BCA (Bicichonine acid assay). Las diluciones para la curva patrón se realizaron con un kit de ensayo de proteínas BCA (Pierce BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific). La lectura en el espectrofotómetro se realizó a 545 nm.

VIII. WESTERN BLOT

Se prepararon muestras de 20µL de proteína, 15µL de agua mQ y 5µL de buffer de carga (Buffer Laemmli 4x) se colocaron en una cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD) con un gel de poliacrilamida al 4-20% prefabricado (MP TGX BIO-RAD, Hercules, CA) durante 1 hora a 100V. Las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa 0.2µm (BIO-RAD, Hercules, CA) a 500mA por 2h en frío y se incubaron con el anticuerpo primario [Receptor 7 de 5-HT (R-5HT7 Abcam, ab128892, Cambridge, Reino Unido); 17α-hidroxisilasa (CYP17A1 Abcam, ab231914, Cambridge, Reino Unido); 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD Abcam, ab97975, Cambridge, Reino Unido); β-actina ab8226, Cambridge, Reino Unido] durante 12 horas a 4°C, seguido del anticuerpo secundario por 2 horas secundario [Anti-Mouse (Sta. Cruz, #7076, Cell Signaling Technology), Anti-Rabbit (Sta. Cruz, #7074, Cell Signaling Technology)] y se revelaron con Western Sure Premium Chemilium Substrate (LI-COR Biosciences, USA). Finalmente, las membranas se analizaron

mediante un escáner LI-COR (Biosciences, USA), la intensidad de las bandas se analizó mediante el programa Image Studio Digits, V4.0.21 para Windows (Figura 13).

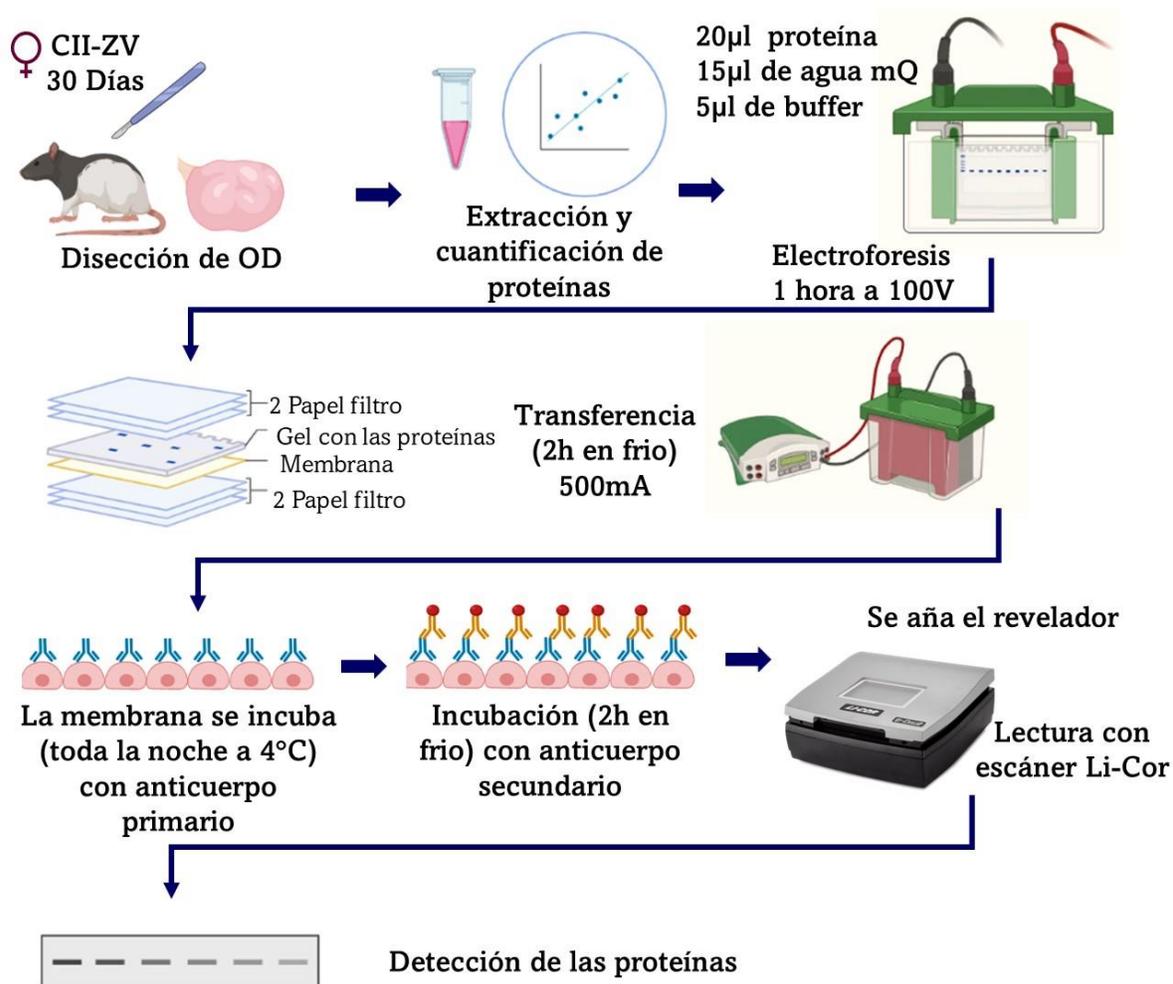


Figura 13. Técnica de Western Blot. OD. Fuente: Elaboración propia con BioRender.

IX. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos se analizaron utilizando el software GraphPad Prism (Versión Prism 9.0.0). El porcentaje de folículos atrésicos se analizó mediante una prueba de chi-cuadrado y se expresan en media \pm error estándar de la media. Los resultados de Western Blot, expresión de las enzimas, CYP17-hidroxilasa, 17 β -HSD y las concentraciones séricas de progesterona y testosterona se expresan en media \pm error estándar de la media y se analizaron mediante ANOVA seguido de una prueba de Tukey. Los resultados fueron considerados significativos cuando la $p \leq 0.05$

RESULTADOS

Desarrollo y atresia folicular

El porcentaje de folículos pequeños (<200 μm), medianos (200-400 μm) y preovulatorios (>400 μm) fue similar en el ovario de los animales que se inyectaron con Vh y con pCA al día 30 y autopsiados a las 120 h (Figura 14A). Cuando se analizó el estado de los folículos se observó que en el ovario de los animales que fueron tratados con pCA, aumentó el porcentaje de folículos atrésicos en sus diferentes etapas de desarrollo con respecto al grupo con Vh (Figura 14B).

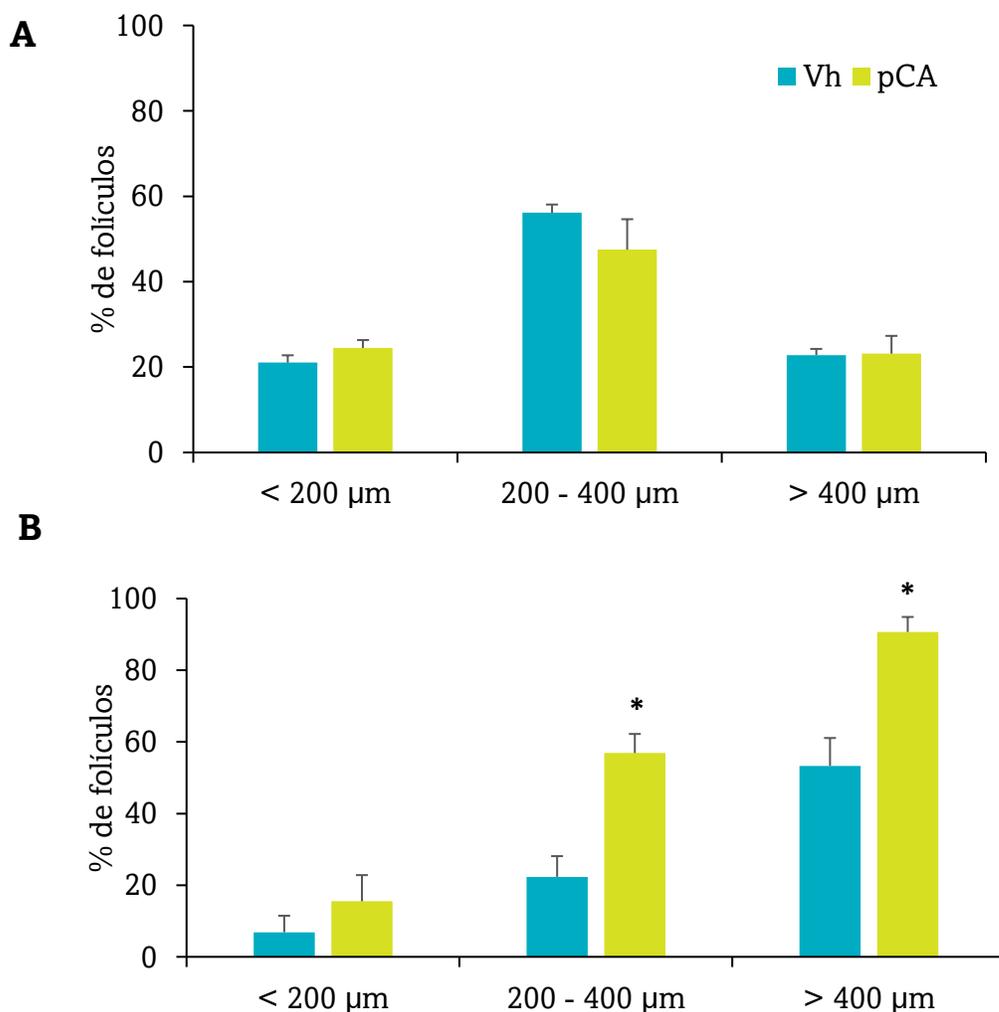


Figura 14. Porcentaje de folículos totales (A) y atrésicos (B). En el ovario de la rata hembra inyectada con solución salina (Vh) o tratadas con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y autopsiadas a las 120 h. * $P < 0.001$ vs. Vh (Chi-cuadrada).

En la figura 15 A-C, se presenta una fotomicrografía donde se observan folículos sanos (A-D) en el ovario de los animales tratados con Vh y folículos atrésicos (E-F) en los animales inyectados con pCA y autopsiados a las 120 h.

El incremento en el porcentaje de folículos con signos de atresia folicular fue mayor en los folículos medianos (200-400 μm) y preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$). Entre las características de atresia que se presentan son: fragmentación del ovocito, engrosamiento de la teca, picnosis y descamación de las células de la granulosa (Figura 16).

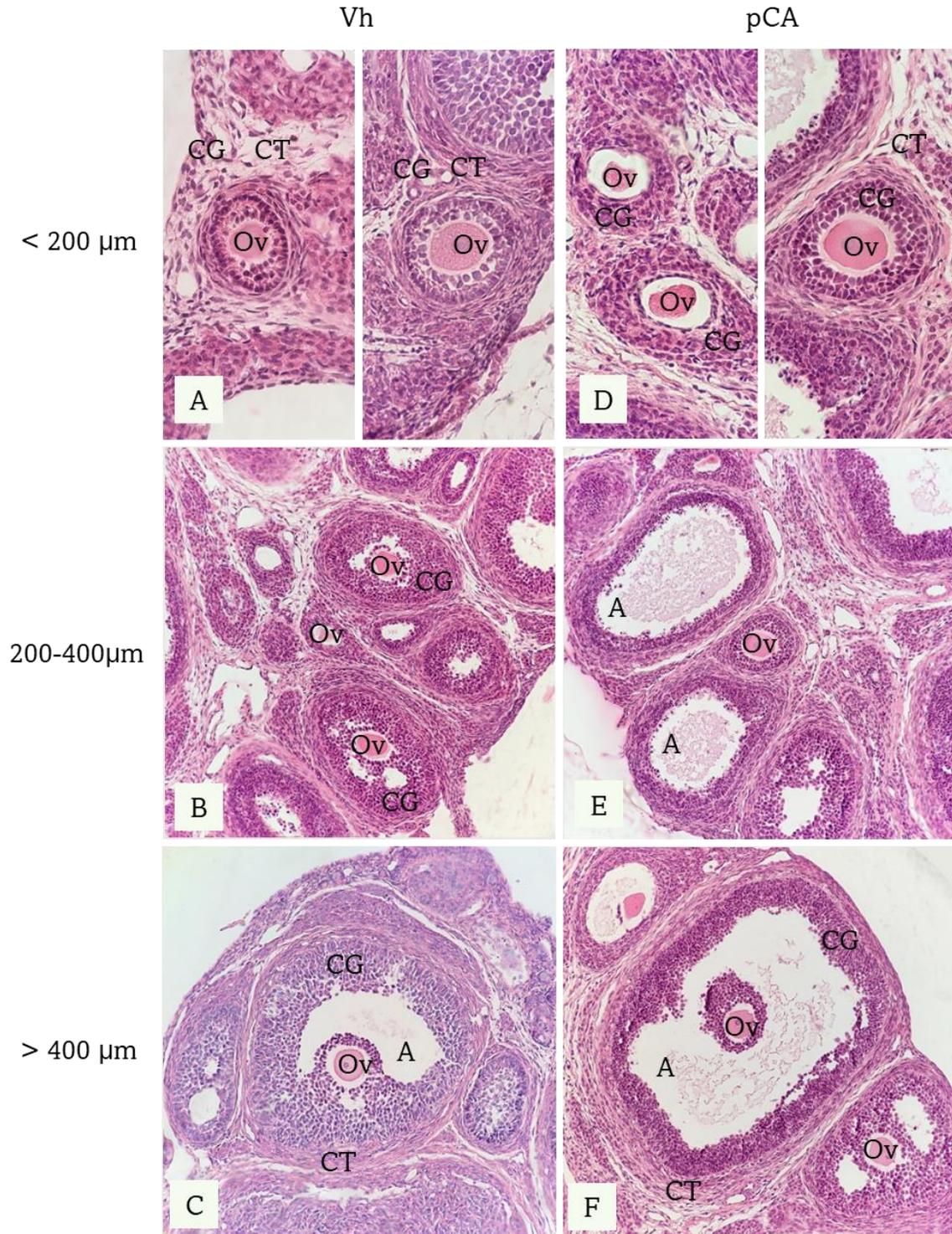


Figura 15. Fotomicrografías de cortes de ovario teñidos con Hematoxilina-Eosina. Folículos de rata hembra inyectada con solución salina (Vh) o p-cloroanfetamina (pCA) al día 30 y autopsiadas a las 120 h. A-D, folículos sanos, E-F; folículos atrésicos. Células de la teca (CT), células de la granulosa (CG), ovocito (OV) antro (A). Las secciones se observaron a diferentes aumentos: 40x (A, D) 20x (B-C, E-F)

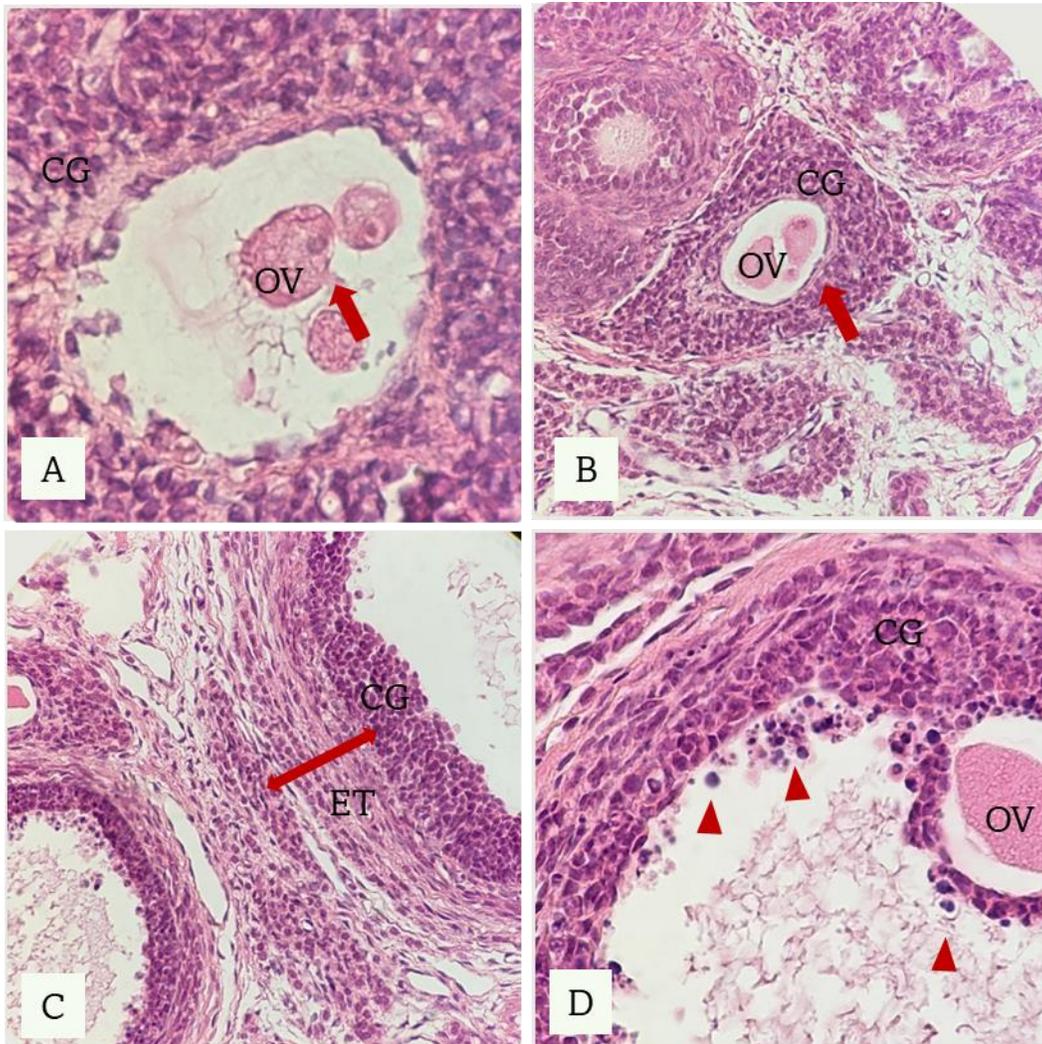


Figura 16. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario de ratas inyectadas con pCA y autopsiadas a las 120 h, teñidos con la técnica de Hematoxilina-Eosina. Las características de atresia que se identifican en las Fotomicrografías son: Fragmentación del ovocito (flechas rojas) (A y B); descamación de la granulosa (puntas de flecha roja) (D), engrosamiento de la teca (ET)(C), células de la granulosa (CG), ovocito (OV). Las secciones se observaron a 40x.

R-5HT7

En la tabla 1 se muestra la localización del R-5HT7 en diferentes compartimentos del ovario de los animales que se inyectaron con Vh o pCA al día 30 y autopsiados a las 120 h, se identificó el R-5HT7 en folículos pequeños (<200 μm), medianos (200-400 μm) y preovulatorios (>400 μm). La expresión de este receptor se presentó principalmente en los ovocitos (Figura 17 B-F) y células de la granulosa (Figura 17 A, D) de los folículos en diferentes etapas del desarrollo independiente del tratamiento recibido. También se observaron algunas células positivas a esta proteína en el estroma de la médula del ovario y alrededor de los vasos sanguíneos (Figura 17-B).

Tabla 1. Localización del R-5HT7 en el ovario de la rata hembra prepúber inyectada con solución salina (Vh) o con 10 mg/Kg de p-cloroanfetamina (pCA) al día 30 y autopsiada a las 120 h.

Componente del ovario	Vh	pCA
Epitelio superficial	-	-
Corteza	+	+
Médula	+	+
Folículo	+	+
Primordial	-	-
Primario	+	+
Preantral	+	+
Antral	+	+
Cuerpo lúteo	-	-
Vasos sanguíneos	+	+

(-) Ausente
(+) Presente

Con base en la intensidad de la inmunotinción, en los animales inyectados con Vh o pCA no se observaron diferencias entre la proporción de folículos que presentaron marca positiva al receptor. La intensidad de la marca baja (<10 células positivas) se presenta con mayor frecuencia en folículos <200 μm , mientras que la intensidad alta (>21 células positivas) se registró en los folículos preovulatorios (>400 μm) (Figura 18).

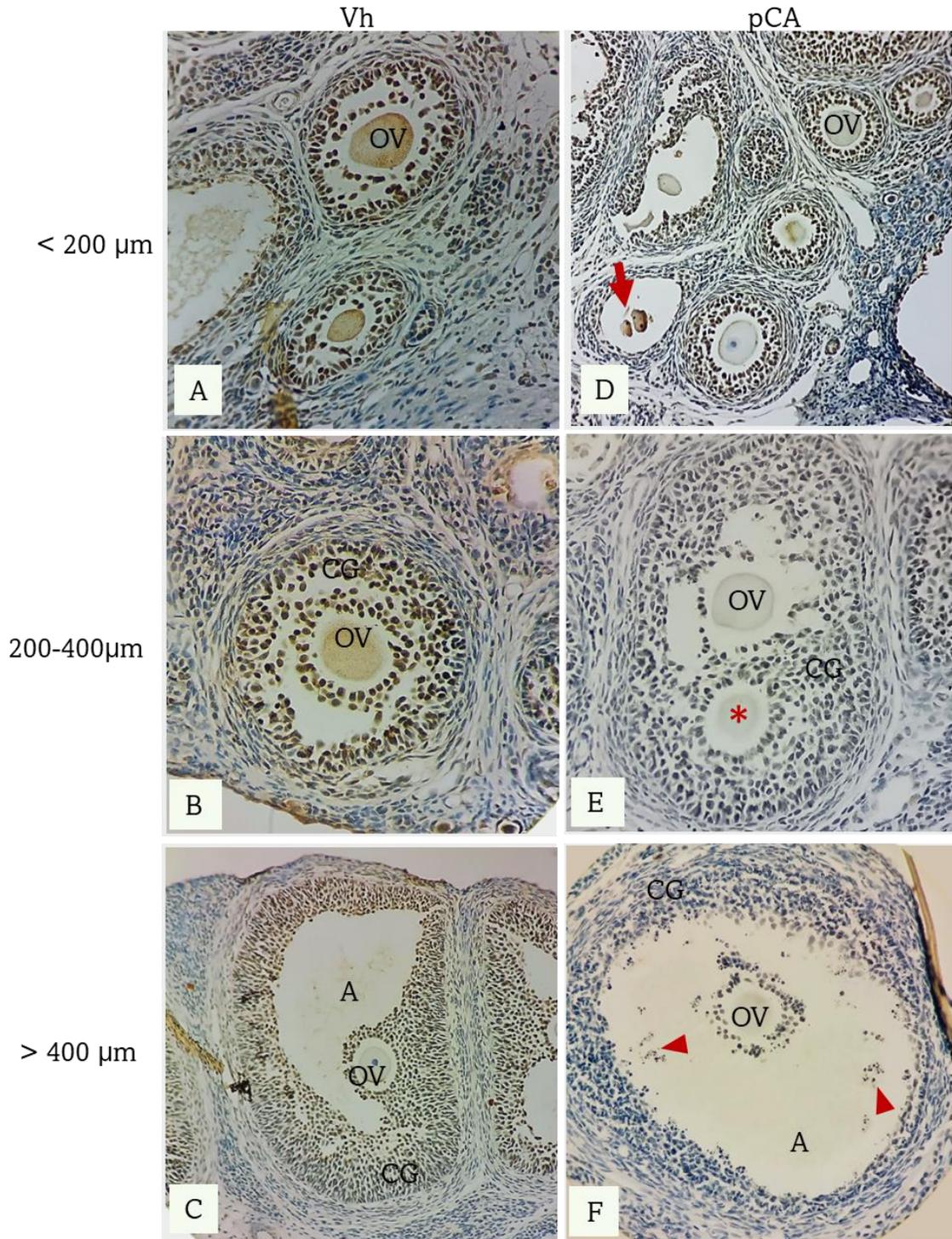


Figura 17. Localización del R5-HT7 por inmunohistoquímica en folículos de rata prepúber inyectada con solución salina (Vh) o p-Cloroanfetamina (pCA) al día 30 y autopsiadas a las 120 h. La tinción positiva se muestra de color marrón. Ovocito (OV); células de la granulosa (CG); antro (A); ovocito fragmentado (flecha roja); folículo con doble ovocito (*); descamación de las células de la granulosa (puntas de flecha roja). Aumento 20x.

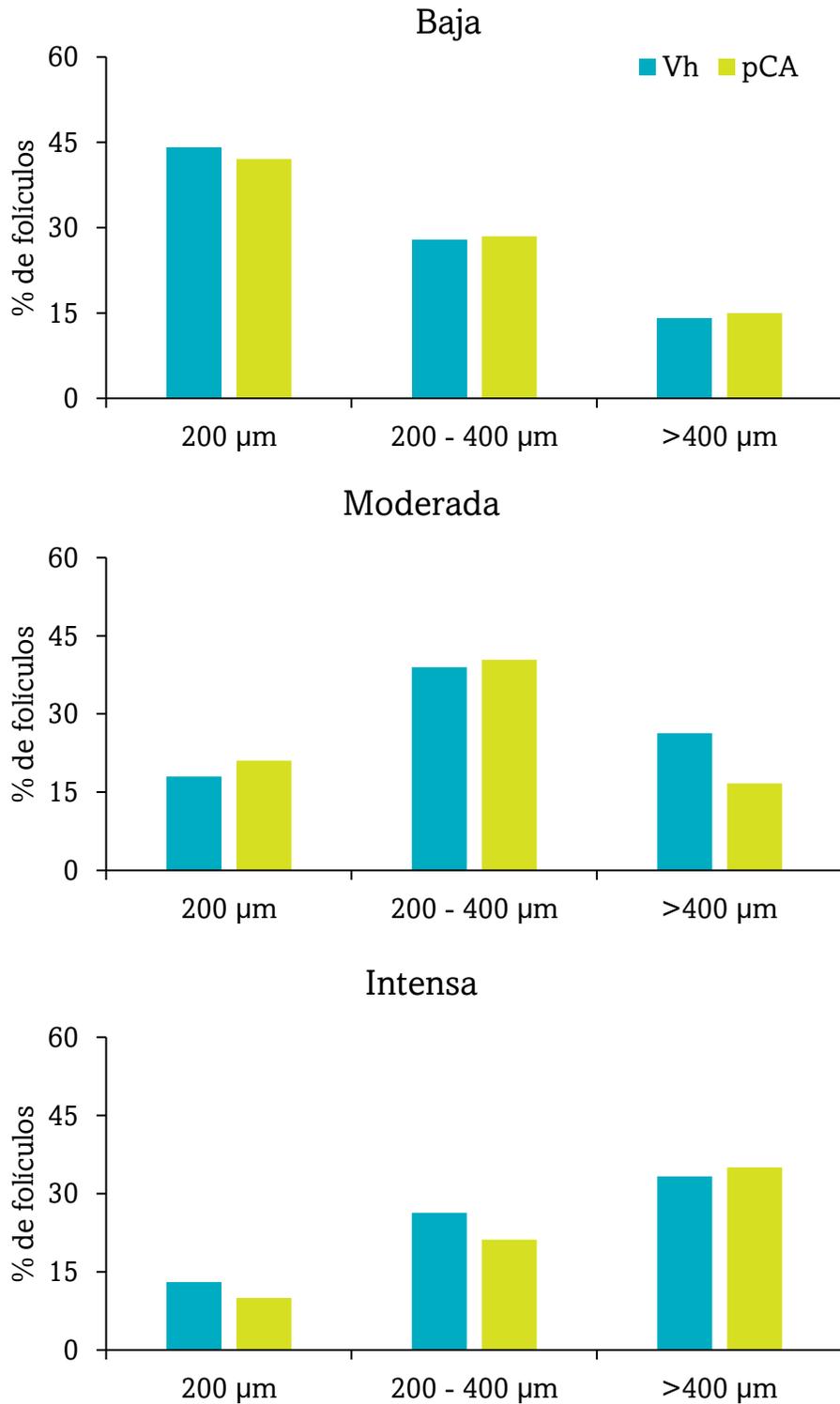


Figura 18. Porcentaje de folículos que presentaron inmunoreactividad para el R-5HT7, baja, moderada o intensa. En los ovarios de ratas a las que se les inyectó solución salina (Vh) o p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y autopsiadas a las 120 h.

CYP17-Hidroxilasa

En los animales inyectados con Vh o pCA, no se modificó la expresión de la proteína CYP17 en comparación con el grupo TA a las 48 h post tratamiento.

Al comparar el grupo TA y Vh a las 120h postratamiento no se modificó la expresión de la CYP17. Mientras que, en los animales que se administró pCA, la expresión de esta enzima disminuyó en relación con el grupo Vh (Figura 19).

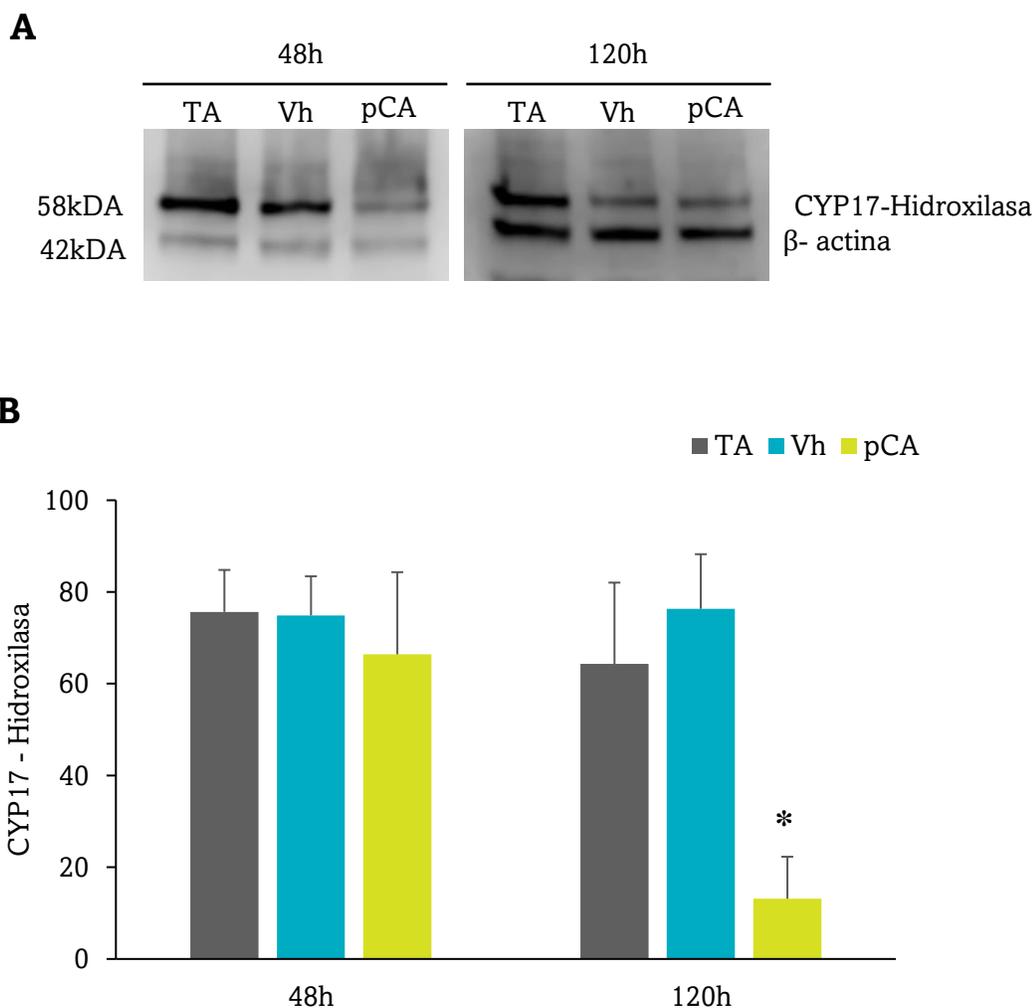


Figura 19. Expresión de la proteína CYP17 en ovario de ratas prepúber testigo absoluto (TA) o tratadas con solución salina 0.9% (Vh) o 10 mg/kg de p-cloroanfetamina (pCA) al día 30 de edad y autopsiadas a las 48 o 120 h post tratamiento (B). La expresión de la enzima fue normalizada con β -actina. $P < 0.022$ vs. Vh (ANOVA seguido de Tukey).

En los ovarios de animales tratados con Vh al día 30 y autopsiados a las 120 h se observó la expresión de la enzima CYP17 en el folículo y cuerpo lúteo (Figura 20 A y B).

Una vez identificados los sitios de expresión de la enzima, se observó que la inmunoreactividad a la proteína CYP17 en células de la teca se presenta con mayor frecuencia en los folículos medianos (200 – 400 μm) y preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$) (Figura 20 B y C), que en contraste con los animales inyectados con pCA, no se observó inmunoreactividad para la CYP17 en los folículos medianos (200 – 400 μm) y preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$), si estos presentaban alguna características de atresia, como picnosis y descamación de las células de la granulosa, engrosamiento en la teca o fragmentación del ovocito (Figura 21 E y F).

Considerando la intensidad de la inmunotinción para la CYP17, se observó que en los ovarios de animales inyectados con Vh, la intensidad de la marca baja (<10 células positivas) y moderada (11-20 células positivas) es mayor en los folículos medianos (200 – 400 μm) y preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$), mientras que la intensidad alta (>21 células positivas) se registró en los folículos preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$). En los animales que se les inyectó pCA, los folículos en las diferentes etapas de desarrollo presentaron inmunoreactividad baja para la CYP17 (Figura 22).

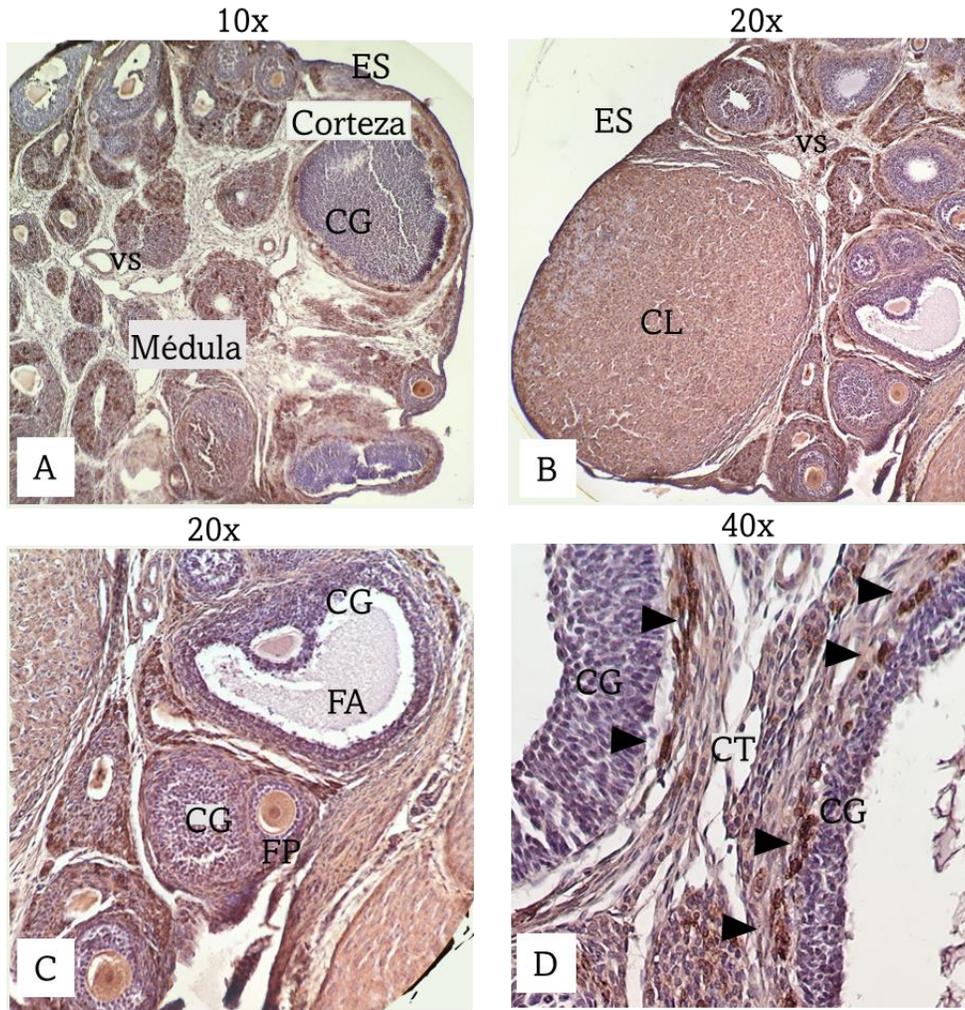


Figura 20. Localización de CYP17 por inmunohistoquímica, en ovario de rata prepúber del grupo Vh (A,C,D) y pCA (B) a las 120 h. La tinción positiva se muestra como color marrón (flechas negras). Epitelio superficial (ES), vaso sanguíneo (VS), células de la teca (CT), células de la granulosa (CG), cuerpo lúteo (CL), folículo pequeño (FP), folículo antral (FA). Las secciones se observaron a diferentes aumentos (10x, 20x, 40x).

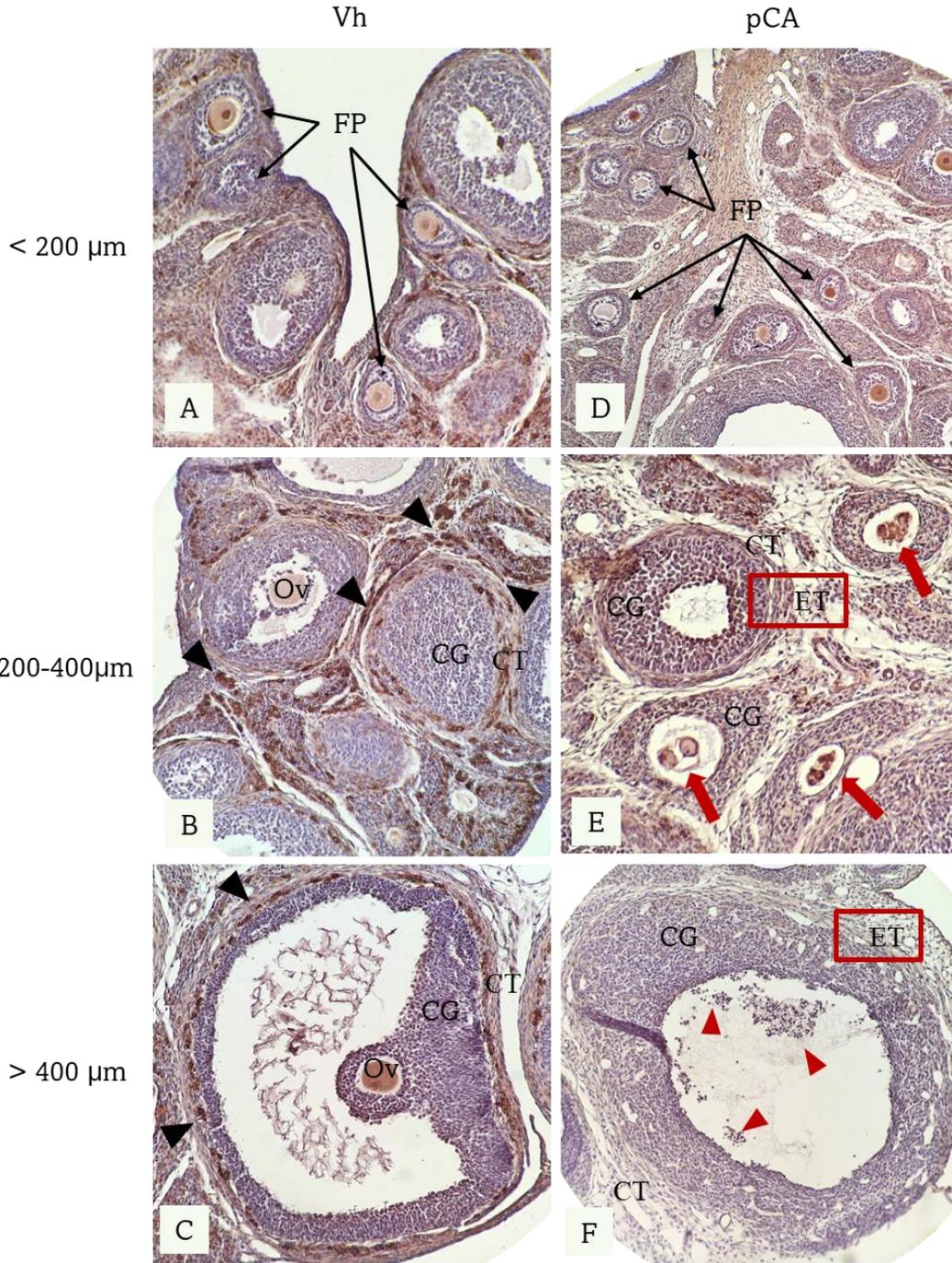


Figura 21. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario teñidos por inmunohistoquímica para CYP17. Folículos de rata hembra inyectada con solución salina (Vh) o p-cloroanfetamina (pCA) al día 30 y autopsiadas a las 120 h. La tinción positiva se muestra como color marrón (puntas de flecha negra). **A-D**, folículos sanos, **E-F**; folículos atrésicos. Folículos pequeños (FP); fragmentación del ovocito (flechas rojas); descamación de la granulosa (puntas de flecha roja), engrosamiento de la teca (ET), células de la teca (CT), células de la granulosa (CG), ovocito (OV). Las secciones se observaron a diferentes aumentos (10x A, D; 20x B-C, E-F)

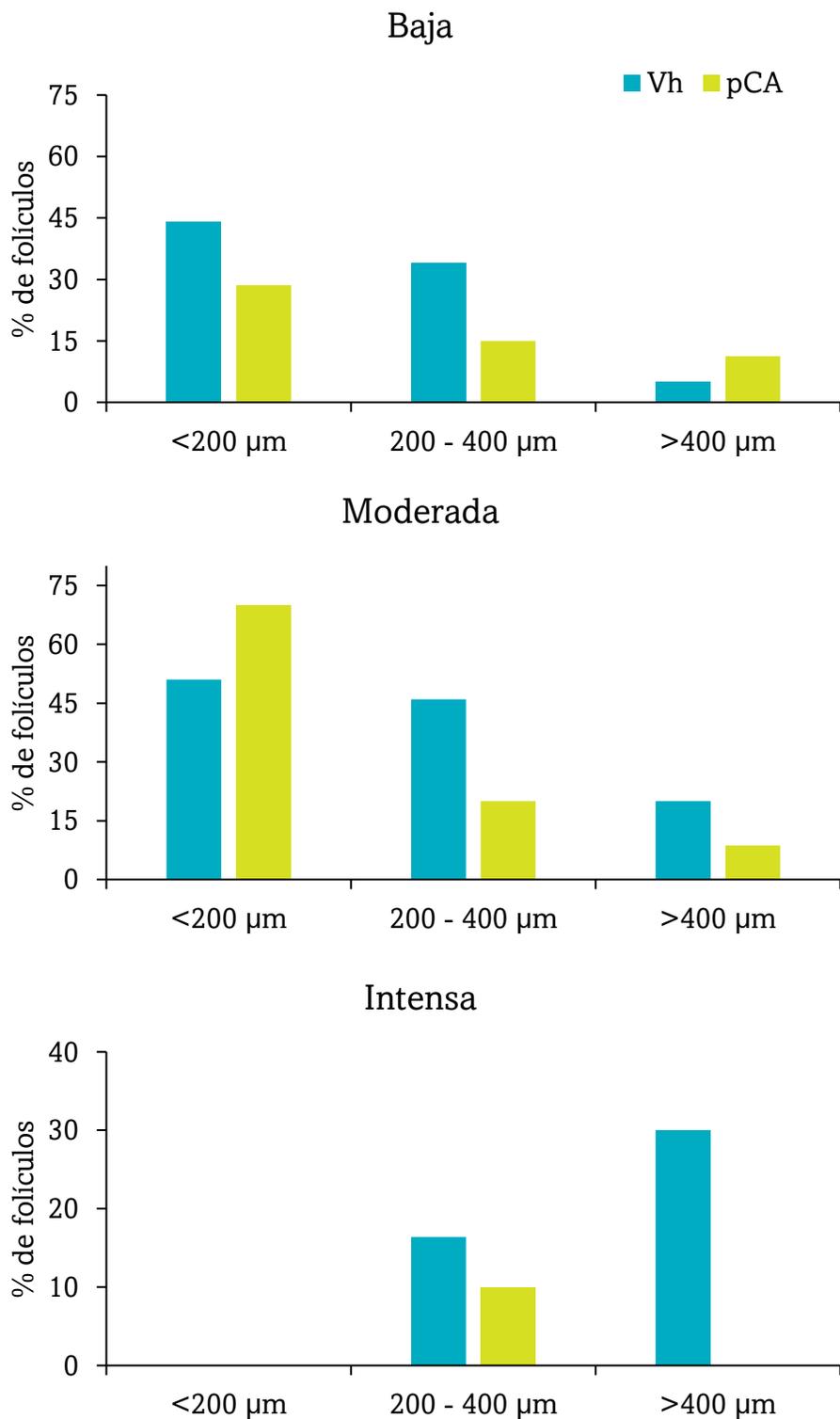


Figura 22. Porcentaje de folículos que presentaron inmunoreactividad para la CYP17; baja, moderada o intensa. En los ovarios de ratas a las que se administró solución salina (Vh) o tratadas con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y autopsiadas a las 120 h.

17 β -HSD

En los animales que fueron inyectados con Vh o pCA al día 30, no se modificó la expresión de la enzima 17 β -HSD en comparación con el grupo TA a las 48 o 120 h post tratamiento (Figura 23).

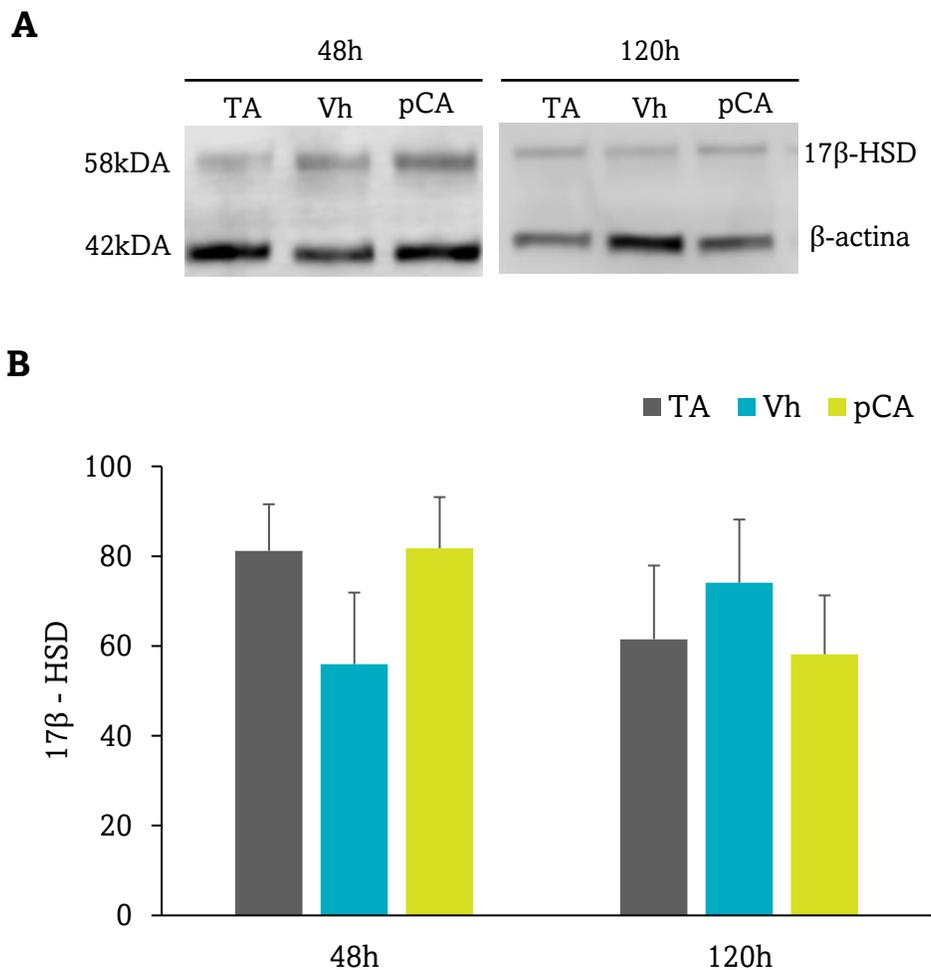


Figura 23. Expresión de la proteína 17 β -HSD en ovario de ratas prepúber testigo absoluto (TA) o tratadas con solución salina 0.9% (Vh) o 10 mg/kg de p-cloroanfetamina (pCA) al día 30 de edad y autopsiadas a las 48 o 120 h post tratamiento (B). La expresión de la enzima fue normalizada con β -actina.

En el ovario de la rata hembra inyectada con Vh al día 30 y autopsiada a las 120 h postratamiento, se observó inmunoreactividad para la enzima 17 β -HSD únicamente en células de la granulosa murales y del cúmulo de los folículos en diferentes etapas del desarrollo independiente del tratamiento recibido (Figura 24).

Considerando la intensidad de la inmunotinción para la 17 β -HSD, se observó que en los ovarios de animales inyectados con Vh o pCA, la intensidad de la marca baja (<10 células positivas) se presenta principalmente en folículos pequeños (<200 μ m) (Figura 24A). Mientras que en los folículos medianos (200 – 400 μ m) y preovulatorios (>400 μ m), presentan inmunoreactividad moderada (11-20 células positivas) e intensa (>21 células positivas) respectivamente (Figura 25).

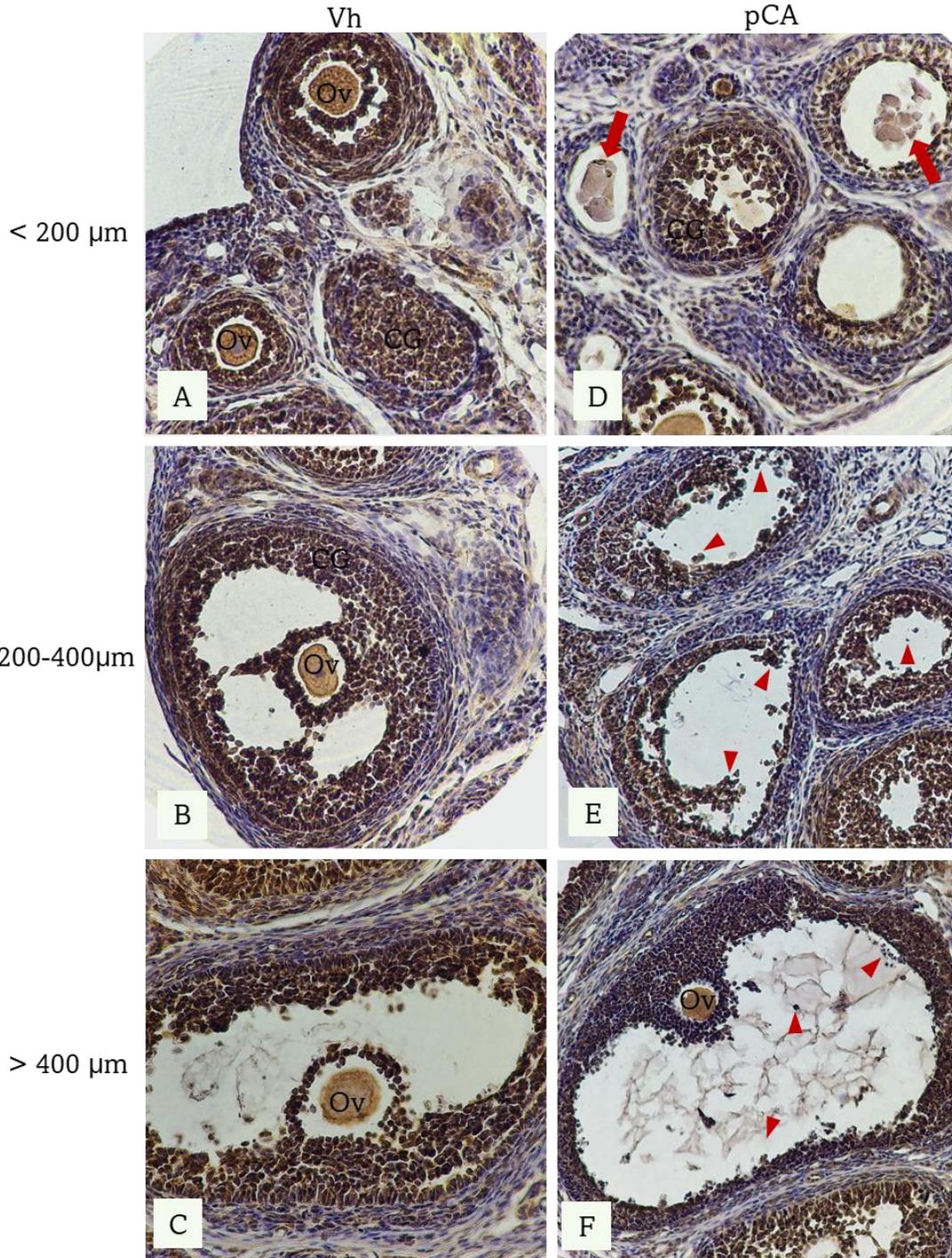


Figura 24. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovario teñidos por inmunohistoquímica para la enzima 17β -HSD en folículos de rata hembra inyectada con solución salina (Vh) o *p*-cloroanfetamina (pCA) al día 30 y autopsiadas a las 120 h. La tinción positiva se muestra con color marrón en células de la granulosa. A-C, folículos sanos, D-F; folículos atréxicos; fragmentación del ovocito (flechas rojas); descamación de la granulosa (puntas de flecha roja), ovocito (OV). Las secciones se observaron a diferentes aumentos (10x A, D; 20x B-C, E-F).

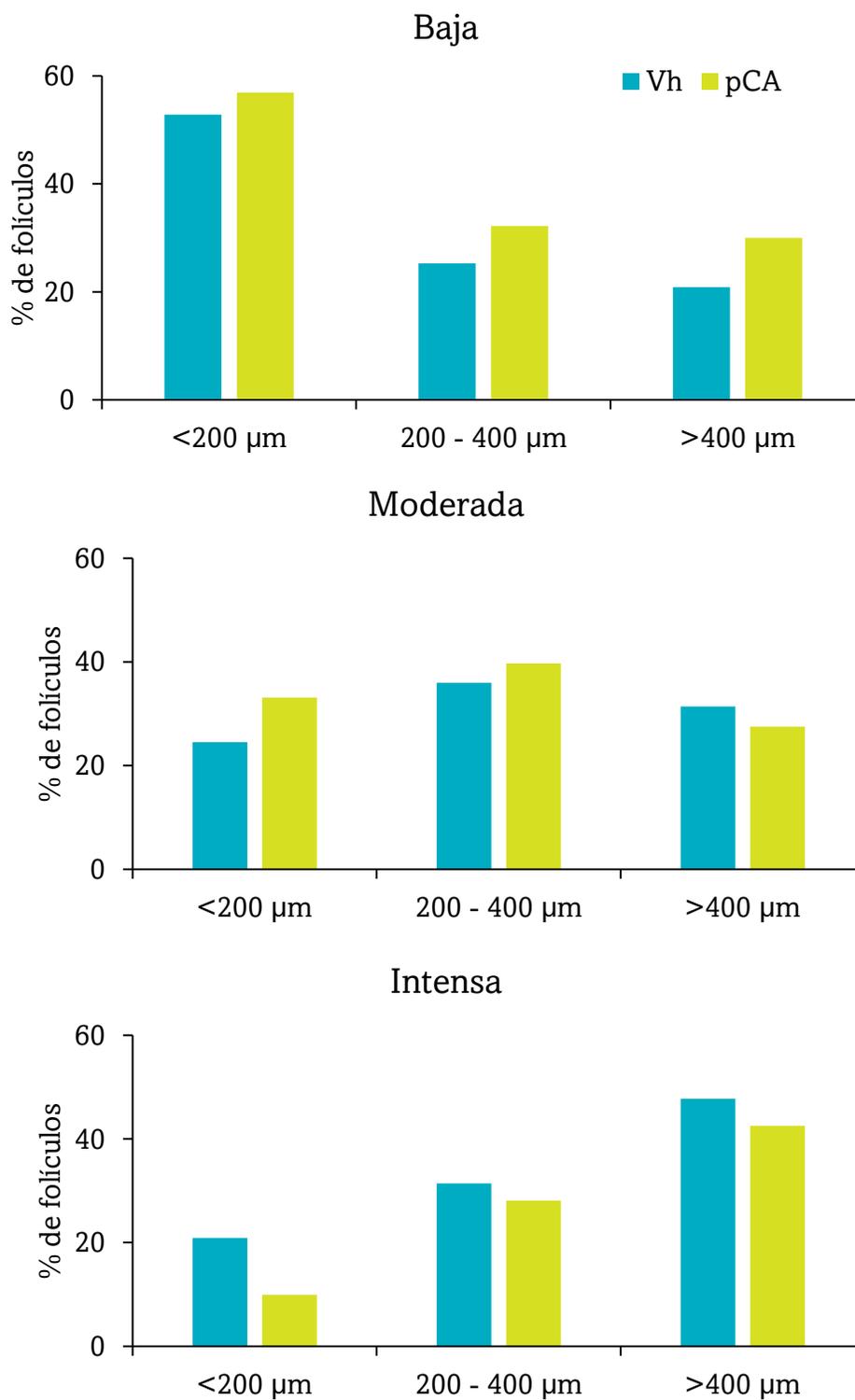


Figura 25. Porcentaje de folículos que presentaron inmunoreactividad para la enzima 17β-HSD baja, moderada o intensa. En los ovarios de ratas a las que se administró solución salina (Vh) o tratadas con p-Cloroanfetamina (pCA) en el día 30 y autopsiadas a las 120 h.

Hormonas esteroides

La concentración de progesterona en el suero de animales Vh autopsiado a las 48 h post tratamiento no se modificó en comparación con el grupo TA. En los que se les inyectó la pCA disminuyó la concentración de esta hormona (Figura 26A), pero no se observaron cambios significativos en los animales autopsiados a las 120 h. La testosterona, no presentó cambios en la concentración a las 48 o 120h en ningún grupo experimental (Figura 26B).

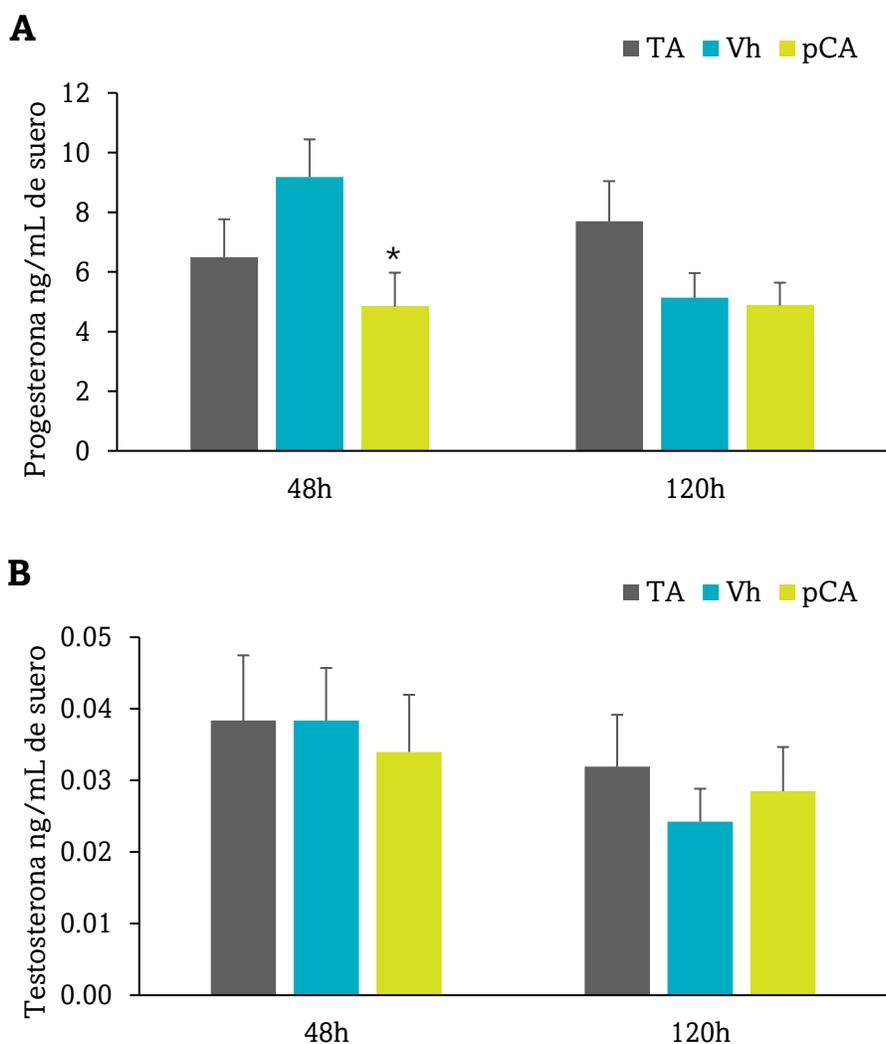


Figura 26. Concentración de progesterona (A) y testosterona (B) en suero de ratas prepúber testigo absoluto (TA) o tratadas con solución salina 0.9% (Vh) o 10 mg/kg de p-cloroanfetamina (pCA) al día 30 de edad y autopsiadas a las 48 o 120 h post tratamiento. $P < 0.0489$ vs. Vh (ANOVA seguido de Tukey).

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Con los resultados del presente estudio podemos mostrar que la inhibición del sistema serotoninérgico inducido por la administración de pCA, incrementa la atresia folicular, disminuye la expresión de las enzimas que regulan la esteroidogénesis y la producción de esteroides sexuales por el ovario. Esta idea se sustenta en el hecho de que se observó el aumento en el número de folículos atrésicos, la disminución en la expresión de la enzima CYP17 y de la concentración de progesterona en el suero de los animales que recibieron pCA.

Con base en resultados publicados por nuestro grupo de trabajo (Gallegos *et al.*, 2022), se muestra que en la rata hembra prepúber de 30 días de edad, la administración por vía sistémica de 10 mg/Kg de peso corporal de pCA, disminuye la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio, en la hipófisis y en el ovario. La disminución en las concentraciones de la 5-HT en los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, es de hasta un 40 %. Weng y colaboradores (2015) observaron la reducción en la concentración de 5-HT en el cerebro y en el suero de ratas adultas cuando se les inyectó el derivado de las anfetaminas, la p-Clorofenilalanina (pCPA). Este efecto de inhibición del sistema serotoninérgico es el resultado de la acción de la pCA sobre la enzima limitante en la síntesis de la 5-HT, la TPH, ya que se reporta que la pCA inhibe la actividad de esta enzima (Schmidt y Taylor, 1987; Simmler *et al.*, 2018), presente tanto en el SNC como en el ovario entre otros tejidos y órganos periféricos. La idea de que la disminución en la concentración 5-HT es el resultado de la inhibición de la TPH, se sustenta a partir de los resultados obtenidos por Walther y colaboradores (2003), quienes observaron que en ratones *Knockout* para la TPH1 hay una menor concentración de 5-HT en la hipófisis y tejidos periféricos (Walther *et al.*, 2003). Así mismo, en los ratones *Knockout* para la isoforma de la TPH2, es menor la concentración de 5-HT en el cerebro (Weng *et al.*, 2015). Con base en lo antes mencionado, la pCA inhibe tanto al sistema serotoninérgico del cerebro y de tejidos periféricos, como el ovario. Con relación a la gónada de la hembra se reporta que, en el ovario del ratón, en las células de la granulosa del cúmulus y en el ovocito se expresa la isoforma de la TPH1 (Gustafsson *et al.*, 2006; Dubé & Amireault, 2007).

Es posible que el aumento en la atresia folicular sea resultado de la inhibición del sistema serotoninérgico del hipotálamo-hipófisis-ovario, inducido por la inyección de pCA. Con relación al hipotálamo, cuando a la rata hembra prepúber se le administra pCA por vía sistémica, disminuye la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio (Gallegos *et al.*, 2022), regiones donde se ubican los somas y las terminales de las neuronas productoras de la GnRH, respectivamente (Gupta & Chia, 2015). En apoyo a esta idea se ha mostrado que la 5-HT estimula la secreción de GnRH vía su unión al R5-HT2A, al activar la vía de señalización PKC (Bhattarai *et al.*, 2014). Por ello, es posible que, al disminuir la concentración de 5-HT en el hipotálamo se modificara la secreción de GnRH y disminuye la secreción de la FSH, hormona que estimula el desarrollo de los folículos antrales y mantienen la sobrevivencia de las células de la granulosa (Filatov *et al.*, 2017), lo que explica el incremento en la atresia folicular que se observó en los animales inyectados con pCA.

En el ovario, la FSH estimula la expresión de genes implicados en la proliferación celular, activa factores de transcripción que regulan la actividad de la aromatasa, la producción de inhibina y la expresión de los receptores de LH y promueve la producción de estrógenos, el crecimiento folicular y disminuye la apoptosis de las células de la granulosa (Fan *et al.*, 2010; Filatov *et al.*, 2017).

El conocimiento sobre la acción de la FSH en el desarrollo folicular se ha obtenido en parte a partir de los modelos de ratón *Knockout* para el gen que codifica para la subunidad β de la FSH (Durlinger *et al.*, 2001) o para los receptores a la FSH (Casarini *et al.*, 2015) y en estudios *in vitro* (Adriaens *et al.*, 2004). Los ovarios de ratones FSH β KO son más pequeños, aumenta el número de folículos pequeños y el desarrollo folicular no progresa debido a que se detiene en la etapa preantral (Durlinger *et al.*, 2001), por otro lado, los ratones que no expresan el receptor FSHR, son infértiles (Casarini *et al.*, 2015). En los folículos ováricos de rata en cultivo, la tasa de proliferación de las células de la granulosa depende de la presencia de la adición de la FSH al medio y como resultado de la acción de esta gonadotropina, se produce el estradiol (Adriaens *et al.*, 2004). Con base en esto, se propone que la deficiencia en la producción de la FSH impide la formación de los folículos antrales, mientras que la población de folículos preantrales no se modifica, debido a que el desarrollo de estos folículos es independiente de las gonadotropinas y es regulado por otras proteínas,

como, la proteína morfogénica del hueso (BMP-15) o el factor 9 de diferenciación del crecimiento (GDF-9) (Uyar *et al.*, 2013).

Con base en lo reportado en bibliografía, es posible que el incremento en la atresia de los folículos preovulatorios (>400 μm) que se observó en los animales inyectados con pCA sea el resultado de la disminución en la secreción de la FSH.

La apoptosis es un proceso de muerte celular que se produce de forma natural con la finalidad de mantener el número de células en un tejido u órgano que le permita llevar a cabo sus funciones. El incremento en la muerte por apoptosis conduce al daño en el mismo y como consecuencia modifica su funcionamiento (Elmore, 2007). En el ovario, la apoptosis se caracteriza por cambios morfológicos como la picnosis de los núcleos de las células de la granulosa y formación de cuerpos apoptóticos (Zhou *et al.*, 2019). En el presente estudio se observó que en los ovarios de las ratas inyectadas con pCA, los folículos antrales presentaron las siguientes características morfológicas: descamación de las células de la granulosa en el antro, posiblemente como resultado de la pérdida de la comunicación célula-célula; núcleos picnóticos en las células de la granulosa; presencia de cuerpos apoptóticos en el antro folicular y fragmentación de ovocito. Lo anterior nos lleva a sustentar que en los animales inyectados con pCA se incrementó la apoptosis en los folículos.

La apoptosis y como consecuencia la atresia folicular es el resultado de la deficiencia en la producción de las gonadotropinas, los estrógenos y los factores de crecimiento (Filatov *et al.*, 2017). Por ello, es posible que en los animales que se inyectaron con pCA, la disminución en la concentración de 5-HT en el hipotálamo, genere la desregulación en la producción de GnRH y de la FSH, lo que activó la muerte celular programada o apoptosis de las células de la granulosa, y como consecuencia el incremento en la atresia folicular. En apoyo a esta idea, Dürlinger y colaboradores (2000), mostraron que en la rata adulta la administración de un antagonista de la GnRH, Org30276, induce la fragmentación del ADN de las células de la granulosa y la degradación de la zona pelúcida que rodea al ovocito, y la atresia de los folículos preovulatorios.

Otro de los factores que posiblemente contribuyó al incremento en la atresia folicular que se observó en los animales inyectados con pCA, posiblemente se asocia a la desregulación en la producción de estradiol. En relación con esto, Gallegos y colaboradores (2022), mostraron que cuando a la rata prepúber de 30 días de edad se le inyecta pCA se inhibe al sistema serotoninérgico del ovario y esto se acompaña de la disminución en la concentración de estradiol. Se ha demostrado que los estrógenos inhiben la apoptosis en las células de la granulosa y favorecen el desarrollo del folículo ovárico debido a que el estradiol, incrementa la proliferación de las células de la granulosa, estimula el desarrollo del folículo, e induce la formación de los receptores a FSH y LH en las células de la granulosa (Richards, 2018).

Los estrógenos ejercen su acción en el folículo vía su unión a los receptores alfa ($ER\alpha$) y beta ($ER\beta$) que se expresan en las células de la granulosa (Hamilton *et al.*, 2017). En los ratones *Knockout* para el $ER\beta$ cuando se les administran estrógenos, la proliferación de las células de granulosa está disminuida y no se forma el complejo cúmulus-ovocito, lo anterior conduce a la disminución del número de folículos preovulatorios (Jamnongjit & Hammes, 2006.). Resultados similares se observaron en ratones *Knockout* para esta enzima aromataza, que se expresa en las células de la granulosa y transforma los andrógenos a estrógenos (Ventura *et al.*, 2019). En estos ratones, la disminución en la proliferación celular, del desarrollo del folicular y el aumento de la atresia se acompaña de la deficiencia en la producción de estrógenos (Bayne *et al.*, 2011).

Además de la posible deficiencia en la secreción de FSH por la hipófisis, también es probable que se modificara la secreción de estrógenos por el ovario, en respuesta a la disminución en la producción de 5-HT en la gónada de la rata inyectada con pCA, como ya se ha mostrado (Gallegos *et al.*, 2022). Lo anterior explica el incremento en la atresia folicular. Se reporta que, en el ovario de ratón, específicamente en las células de la granulosa del cúmulus se expresan los receptores 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇, mientras que en el ovocito se expresa el receptor 5-HT_{1D} y 5-HT₇ (Dubé & Amireault 2007). En el presente estudio, se identificó por inmunohistoquímica el R-5HT₇ en el ovocito y en células de la granulosa de los folículos en diferentes etapas del desarrollo, lo que coincide con lo reportado en bibliografía para el ratón (Amireault & Dubé, 2005). La presencia de este receptor en los

componentes del folículo nos lleva a proponer que la 5-HT intraovárica al unirse a este receptor activa una vía de señalización que conduce a la formación de segundos mensajeros como el AMPc y que están implicada en el desarrollo o función del folículo ovárico.

Actualmente no existen estudios que vinculen la activación o inhibición del R5-HT con el desarrollo del folículo ovárico o en el mantenimiento de la estructura del ovario. Sin embargo, en otros tejidos como la glándula mamaria, el R5-HT7 activa vías de señalización asociadas a la proliferación y diferenciación celular del epitelio alveolar y estimula la formación de las vesículas secretoras de leche (Pai *et al.*, 2015; Cinar *et al.*, 2022). Del mismo modo, en el hígado, regula la proliferación de los hepatocitos e induce la lipólisis en los adipocitos y promueve la gluconeogénesis en los hepatocitos lo que contribuye a la regeneración del tejido hepático (Tzirogiannis *et al.*, 2014). En tejido placentario este receptor se expresa en vasos sanguíneos, mediando la respuesta inmune con la liberación de citoquinas como IL-1 β , IL-6 y TNF α entre los monocitos (Irge *et al.*, 2016).

También se ha reportado que el R5-HT7 estimula la secreción de hormonas esteroides, como la aldosterona en la zona glomerular y de esteroides sexuales en la zona reticular de la glándula adrenal (Lenglet *et al.*, 2000) y en cuerpos lúteos promueve la secreción de progesterona (Graveleau *et al.*, 2000). Lo anterior nos lleva a proponer que la 5-HT vía su unión al R5-HT7 podría estar estimulando la proliferación y diferenciación celular en los folículos ováricos y que podría tener un papel estimulante en la esteroidogénesis ovárica.

Gallegos y colaboradores (2022), mostraron que cuando a la rata hembra de 30 días de edad se les inyecta pCA, disminuye la concentración de estradiol en el suero. Sin embargo, actualmente no se cuenta con información sobre el efecto de los derivados de las anfetaminas en las enzimas que participan en la esteroidogénesis. En el presente estudio evaluamos la expresión de las enzimas de la CYP17-Hidroxilasa y 17 β -HSD. La primera participa en la biosíntesis la pregnenolona en 17OH pregnenolona y luego en dehidroepiandrosterona (DHEA), también convierte progesterona a androstenediona en células de la teca. La 17 β -HSD, regula la producción de testosterona y estradiol en las células de la granulosa, pasos esenciales de la esteroidogénesis (Pelletier *et al.*, 2001; Bremer, 2010; Lew 2019)

Se observó que la inmunoreactividad de la enzima CYP17, en el cuerpo lúteo y en las células de la teca de los folículos medianos (200 – 400 μm) y preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$) coincide con lo reportado en bibliografía (Miller & Auchus, 2011).

La disminución en la presencia de la CYP17 en el ovario de los animales que se les inyectó la pCA, nos lleva a mostrar que la inhibición del sistema serotoninérgico del hipotálamo y del ovario se acompaña de la desregulación en la expresión de la CYP17, evento que no se acompañó de la disminución en la concentración de testosterona en el suero de estos animales (Figura 26). Por ello, es posible que la disminución en la actividad de esta enzima, esté provocando cambios en la producción de otro andrógeno como la DHEA o androstenediona o sus precursores. Lo anterior se sustenta a partir de los resultados obtenidos por Ortega y colaboradores (2014), quienes observaron que en la rata se le inyecta resveratrol un inhibidor de la producción de andrógenos, disminuye hasta en un 95 % la expresión de la CYP17 de las células de la teca, que se acompañó de la disminución en la concentración de androstenediona. Resultados similares se observaron en cultivos de células de teca humana, la adición de hormona antimülleriana (AMH), disminuye la expresión de la enzima CYP17 y la concentración de androstenediona (40%) y testosterona (35%) (Chen *et al.*, 2023).

Por otra parte, se reporta que, en las células de la granulosa de los folículos preovulatorios, la CYP17 cataliza la transformación de pregnenolona a progesterona (Gupta & Chía, 2013). Lo anterior nos permite explicar la disminución en concentración de progesterona que se observó en los animales inyectados con pCA y autopsiados a las 48 h post tratamiento. En apoyo a esta idea, se reporta que, en cultivos de células de la teca aisladas de ratas hembra de 30 días de edad, al adicionar simvastatina, inhibidor de la producción de andrógenos al medio de cultivo, disminuye la concentración de progesterona (38%) (Ortega *et al.*, 2014). Sin embargo, no podemos descartar el efecto en la disminución en la concentración de progesterona sea resultado de la modificación de otra enzima de la esteroidogénesis, la 3β -HSD que participa en la síntesis de progesterona a partir de pregnenolona.

A las 120 h postratamiento no se observaron cambios significativos en la concentración de progesterona, a pesar de que se esperaría que, al inhibir la expresión de la CYP17, continuaría la disminución en la producción de progesterona, esto puede ser el resultado de la acumulación de progesterona provocada por la inhibición de esta enzima que también participa en la conversión de progesterona en androstenediona. Otra posibilidad es que, la presencia de cuerpos lúteos en el ovario de estos animales, en los cuales se observó inmunoreactividad a la CYP17- Hidroxilasa y que son una fuente importante de producción de progesterona en el ovario (Gershon & Dekel, 2020), contribuyó a que no se modificara la concentración de progesterona a las 120 h. Al mismo tiempo, la presencia de cuerpos lúteos a esta edad (35 días) indica un adelanto en inicio de la pubertad y la primera ovulación, que para la cepa CII-ZV (Long Evans) es: apertura vaginal, 38.12 ± 0.45 ; primera ovulación, 39.11 ± 0.72 (Clark & Price, 1981; Beckman & Fewston, 2003; Romero *et al.*, 2016).

En nuestro estudio, la inmunoreactividad para la enzima 17β -HSD, se presentó en las células de la granulosa, lo que coincide con lo descrito previamente en la literatura (Akinola *et al.*, 1997; Gómez *et al.*, 2012), quienes reportan que esta enzima se expresa exclusivamente en las células de la granulosa. En los animales que se inyectaron con pCA no se modificó la expresión de esta proteína, sin embargo, Gallegos y colaboradores (2022), mostraron que en las ratas hembra inyectadas con este derivado de las anfetaminas disminuye la concentración de estradiol en el suero.

La enzima 17β -HSD, favorece la conversión de androstenediona en testosterona y la estrona en estradiol (Strauss *et al.*, 2014). Karman y colaboradores (2012), observaron que cuando se administran dioxinas, 2,3,7,8-tetraclorodibenzo-p-dioxina, al medio de cultivo con folículos antrales de ratón, disminuye la transcripción y expresión de la 17β -HSD, así como la secreción de 17β -estradiol. Con base en estas evidencias y los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible que, el hecho de que no se modificará la expresión de la 17β -HSD, posiblemente en los animales que se les inyecta pCA se modificó la enzima encargada de aromatizar la testosterona en estradiol, la aromatasa.

CONCLUSIONES

Los resultados del presente estudio nos permiten concluir que:

1. El R5-HT7 se expresa en el ovario de la rata prepúber, principalmente en células de la granulosa y ovocitos de folículos en todas las etapas del desarrollo.
2. La inhibición del sistema serotoninérgico inducido por la administración de pCA:
 - ❖ Estimula la atresia folicular en los folículos, medianos (200-400 μm) y preovulatorios ($>400 \mu\text{m}$).
 - ❖ Disminuye la concentración de progesterona en el suero.
 - ❖ Disminuye la expresión de la enzima, CYP17-Hidroxilasa.
 - ❖ No modifica la expresión de la enzima, 17 β -HSD
 - ❖ No modifica la expresión del R5-HT7.
3. El uso de la pCA, un derivado de las anfetaminas impacta de forma negativa a la esteroidogénesis y el desarrollo folicular.

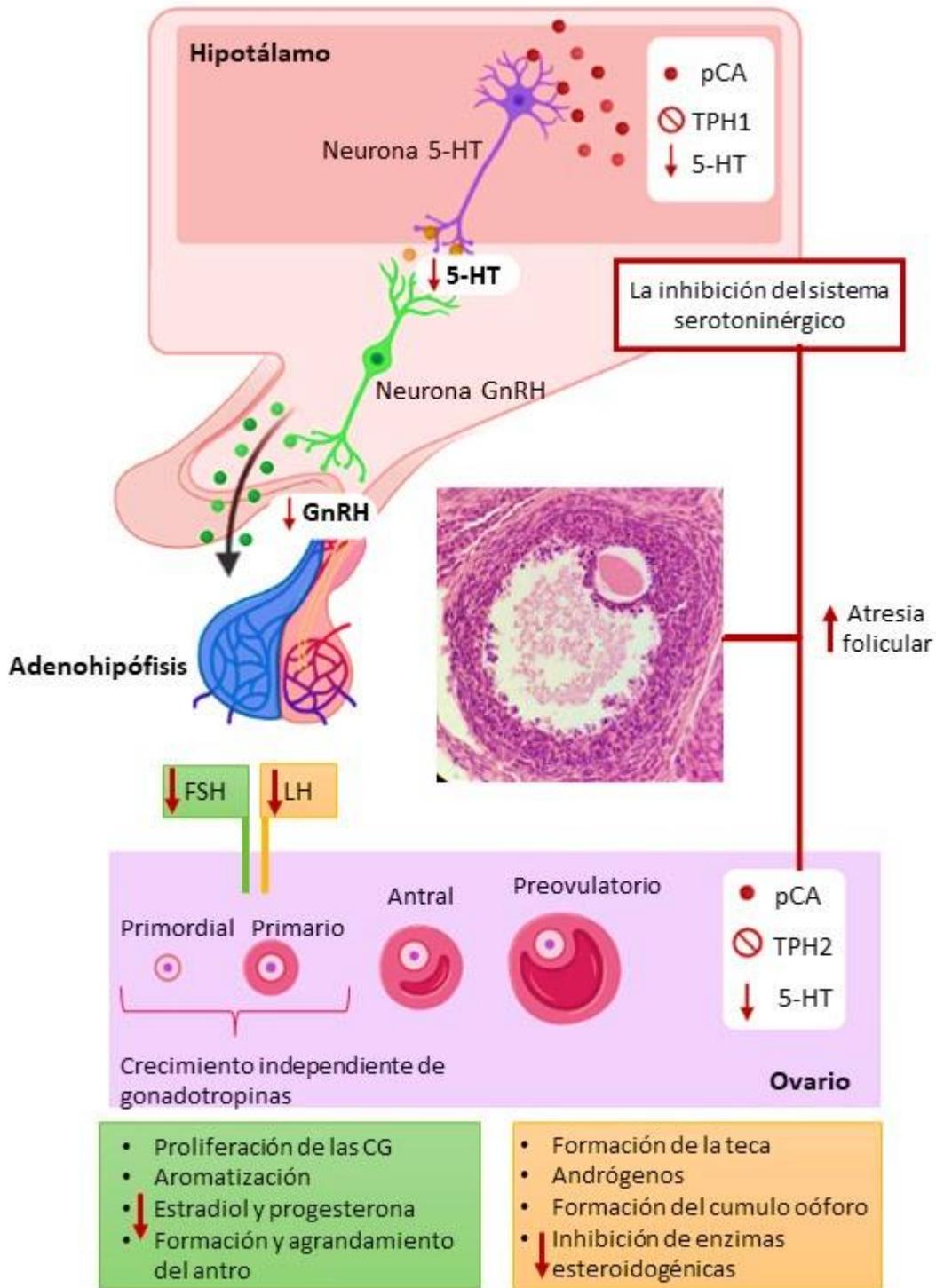


Figura 26. Efectos de la administración de 10 mg/kg de peso corporal de pCA (p-Cloroanfetamina) a la rata hembra prepúber en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. 5-HT, (serotonina); TPH1(triptófano hidroxilasa); TPH2 (triptófano hidroxilasa 2); GnRH (Hormona liberadora de gonadotropina); FSH (Hormona folículo estimulante); LH (Hormona luteinizante). **Fuente:** Elaboración propia con BioRender.

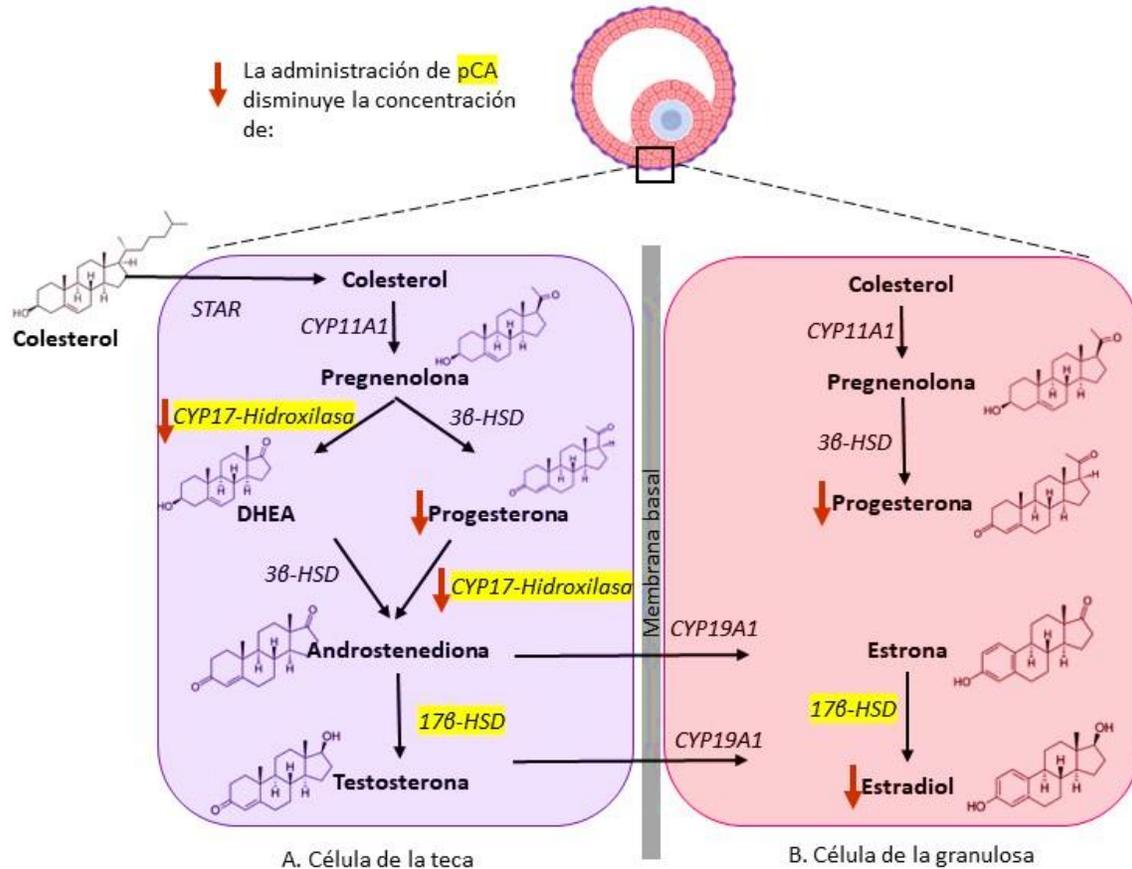


Figura 27. Efectos de la administración de 10 mg/kg de peso corporal de pCA a la rata hembra prepúber en la esteroidogénesis ovárica. 3β-HSD (3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa); 17β-HSD (17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa); DHEA (Dihidroepiandrostenediona). **Fuente:** Elaboración propia con BioRender.

BIBLIOGRAFÍA CONSULTADA

Adriaens, I., Cortvrindt, R., & Smitz, J. (2004). Differential FSH exposure in preantral follicle culture has marked effects on folliculogenesis and oocyte developmental competence. *Human reproduction (Oxford, England)*, *19*(2), 398–408. DOI: [10.1093/humrep/deh074](https://doi.org/10.1093/humrep/deh074)

Arteaga, M. & García, I. (2021). Gametogénesis. Formación del espermatozoide y del ovocito. En *Embriología Humana y Biología del Desarrollo* (pp. 42-53). Editorial Médica Panamericana.

Amenta, F., Vega, J., Ricci, A., & Collier, W. (1992). Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. *The Anatomical record*, *233*(3), 478–484. DOI: [10.1002/ar.1092330315](https://doi.org/10.1002/ar.1092330315)

Amireault, P., & Dubé, F. (2005). Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biology of reproduction*, *73*(2), 358–365. DOI: [10.1095/biolreprod.104.039313](https://doi.org/10.1095/biolreprod.104.039313)

Amireault P, Sibon D, & Côté F. (2013). Life without peripheral serotonin: insights from tryptophan hydroxylase 1 *knockout* mice reveal the existence of paracrine/autocrine serotonergic networks. *ACS Chem Neurosci*, *16*(1):64-71. DOI: [10.1021/cn300154j](https://doi.org/10.1021/cn300154j)

Akinola, L., Poutanen, M., Vihko, R., & Vihko, P. (1997). Expression of 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase type 1 and type 2, P450 aromatase, and 20alpha-hydroxysteroid dehydrogenase enzymes in immature, mature, and pregnant rats. *Endocrinology*, *138*(7), 2886–2892. DOI: [10.1210/endo.138.7.5258](https://doi.org/10.1210/endo.138.7.5258)

Basu, B., Desai, R., Balaji, J., Chaerkady, R., Sriram, V., Maiti, S., & Panicker, M. M. (2008). Serotonin in pre-implantation mouse embryos is localized to the mitochondria and can modulate mitochondrial potential. *Reproduction (Cambridge, England)*, *135*(5), 657–669. DOI: [10.1530/REP-07-0577](https://doi.org/10.1530/REP-07-0577)

Bayne, S., Li, H., Jones, M. E., Pinto, A. R., van Sinderen, M., Drummond, A., Simpson, E. R., & Liu, J. P. (2011). Estrogen deficiency reversibly induces telomere shortening in mouse granulosa cells and ovarian aging in vivo. *Protein & cell*, 2(4), 333–346. DOI: [10.1007/s13238-011-1033-2](https://doi.org/10.1007/s13238-011-1033-2)

Beckman, D. A., & Feuston, M. (2003). Landmarks in the development of the female reproductive system. *Birth defects research. Part B, Developmental and reproductive toxicology*, 68(2), 137–143. DOI: [10.1002/bdrb.10016](https://doi.org/10.1002/bdrb.10016)

Bhattarai JP, Roa J, Herbison AE, Han SK. (2014). Serotonin acts through 5-HT1 and 5-HT2 receptors to exert biphasic actions on GnRH neuron excitability in the mouse. *Endocrinology*, 155(2):513-24. DOI: [10.1210/en.2013-1692](https://doi.org/10.1210/en.2013-1692)

Bremer, A. & Miller, W. (2014). Regulation of Steroidogenesis. En Aguirre, P. & Conn, M. *Cellular Endocrinology in Health, and Disease* (pp- 207-227), Academic Press.

Bremer, A. (2010). Polycystic ovary syndrome in the pediatric population. *Metabolic syndrome and related disorders*, 8(5), 375–394. DOI: [10.1089/met.2010.0039](https://doi.org/10.1089/met.2010.0039)

Casarini, L., Riccetti, L., De Pascali, F., Nicoli, A., Tagliavini, S., Trenti, T., La Sala, G. B., & Simoni, M. (2016). Follicle-stimulating hormone potentiates the steroidogenic activity of chorionic gonadotropin and the anti-apoptotic activity of luteinizing hormone in human granulosa-lutein cells *in vitro*. *Molecular and cellular endocrinology*, 422, 103–114. DOI: [10.1016/j.mce.2015.12.008](https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.12.008)

Cınar, V., Hamurcu, Z., Guler, A., Nurdinov, N., & Ozpolat, B. (2022). Serotonin 5-HT7 receptor is a biomarker poor prognostic factor and induces proliferation of triple-negative breast cancer cells through FOXM1. *Breast cancer (Tokyo, Japan)*, 29(6), 1106–1120. DOI: [10.1007/s12282-022-01391-9](https://doi.org/10.1007/s12282-022-01391-9)

Chaudhari, N., Dawalbhakta, M., & Nampoothiri, L. (2018). GnRH dysregulation in polycystic ovarian syndrome (PCOS) is a manifestation of an altered neurotransmitter profile. *Reprod Biol Endocrinol*. 16(1):37. DOI: [10.1186/s12958-018-0354-x](https://doi.org/10.1186/s12958-018-0354-x)

Clark, B. R., & Price, E. O. (1981). Sexual maturation and fecundity of wild and domestic Norway rats (*Rattus norvegicus*). *Journal of reproduction and fertility*, 63(1), 215–220. DOI: [10.1530/jrf.0.0630215](https://doi.org/10.1530/jrf.0.0630215)

Chaturvedi, G., Arai, K., Limback, D., Roby, K. F., & Terranova, P. F. (2004). Src tyrosine kinase regulates CYP17 expression and androstenedione secretion in theca-enriched mouse ovarian cells. *Endocrine*, 25(2), 147–154. DOI: [10.1385/ENDO:25:2:147](https://doi.org/10.1385/ENDO:25:2:147)

Chen, M., Guo, X., Zhong, Y., Liu, Y., Cai, B., Wu, R., Huang, C., & Zhou, C. (2023). AMH inhibits androgen production in human theca cells. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, 226, 106216. DOI: [10.1016/j.jsbmb.2022.106216](https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2022.106216)

Diaz, F. J., Wigglesworth, K., & Eppig, J. J. (2007). Oocytes determine cumulus cell lineage in mouse ovarian follicles. *Journal of cell science*, 120(Pt 8), 1330–1340. DOI: [10.1242/jcs.000968](https://doi.org/10.1242/jcs.000968)

Di Pilato, P., Niso, M., Adriani, W., Romano, E., Travaglini, D., Berardi, F., Colabufo, N. A., Perrone, R., Laviola, G., Lacivita, E., & Leopoldo, M. (2014). Selective agonists for serotonin 7 (5-HT7) receptor and their applications in preclinical models: an overview. *Reviews in the neurosciences*, 25(3), 401–415. DOI: [10.1515/revneuro-2014-0009](https://doi.org/10.1515/revneuro-2014-0009)

Dubé, F., & Amireault, P. (2007). Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes, and early embryos. *Life sciences*, 81(25-26), 1627–1637. DOI: [10.1016/j.lfs.2007.09.034](https://doi.org/10.1016/j.lfs.2007.09.034)

Durlinger, A. L., Gruijters, M. J., Kramer, P., Karels, B., Kumar, T. R., Matzuk, M. M., Rose, U. M., de Jong, F. H., Uilenbroek, J. T., Grootegoed, J. A., & Themmen, A. P. (2001). Anti-Müllerian hormone attenuates the effects of FSH on follicle development in the mouse ovary. *Endocrinology*, 142(11), 4891–4899. DOI: [10.1210/endo.142.11.8486](https://doi.org/10.1210/endo.142.11.8486)

Edson, M. A., Nagaraja, A. K., & Matzuk, M. M. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, 30(6), 624–712. DOI: [10.1210/er.2009-0012](https://doi.org/10.1210/er.2009-0012)

Elmore S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicologic pathology*, 35(4), 495–516. DOI: [10.1080/01926230701320337](https://doi.org/10.1080/01926230701320337)

Fan, H. Y., O'Connor, A., Shitanaka, M., Shimada, M., Liu, Z., & Richards, J. S. (2010). Beta-catenin (CTNNB1) promotes preovulatory follicular development but represses LH-mediated ovulation and luteinization. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 24(8), 1529–1542. DOI: [10.1210/me.2010-0141](https://doi.org/10.1210/me.2010-0141)

Filatov, M., Khramova, Y., Parshina, E., Bagaeva, T., & Semenova, M. (2017). Influence of gonadotropins on ovarian follicle growth and development in vivo and *in vitro*. *Zygote (Cambridge, England)*, 25(3), 235–243. DOI: [10.1017/S0967199417000168](https://doi.org/10.1017/S0967199417000168)

Gallegos, E., Ascona, M., Monroy, J., Castro-Manrreza, M. E., Aragón-Martínez, A., & Ayala, M. E. (2022). p-Chloroamphetamine decreases serotonin and induces apoptosis in granulosa cells and follicular atresia in prepubertal female rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 110, 150–160. DOI: [10.1016/j.reprotox.2022.04.006](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2022.04.006)

Granot, Z., Geiss-Friedlander, R., Melamed-Book, N., Eimerl, S., Timberg, R., Weiss, A., Hales, K., Hales, D., Stocco, D., & Orly, J. (2003). Proteolysis of normal and mutated steroidogenic acute regulatory proteins in the mitochondria: the fate of unwanted proteins. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)*, 17(12), 2461–2476. DOI: [10.1210/me.2003-0074](https://doi.org/10.1210/me.2003-0074)

Gómez, E., Larrea, F. & Martínez, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15 (1): 24-36.

Gustafsson, B. I., Thommesen, L., Stunes, A. K., Tommeras, K., Westbroek, I., Waldum, H. L., Slørdahl, K., Tamburstuen, M. V., Reseland, J. E., & Syversen, U. (2006). Serotonin and fluoxetine modulate bone cell function *in vitro*. *Journal of cellular biochemistry*, 98(1), 139–151. DOI: [10.1002/jcb.20734](https://doi.org/10.1002/jcb.20734)

Guseva, D., Wirth, A., & Ponimaskin, E. (2014). Cellular mechanisms of the 5-HT7 receptor-mediated signaling. *Frontiers in behavioral neuroscience*, 8, 306. DOI: [10.3389/fnbeh.2014.00306](https://doi.org/10.3389/fnbeh.2014.00306)

Gupta, M., & Chia, S. (2015). 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. DOI: [/10.1007/978-1-4614-6837-0_1](https://doi.org/10.1007/978-1-4614-6837-0_1).

Graveleau, C., Paust, H., Schmidt-Grimminger, D., & Mukhopadhyay, A. (2000). Presence of a 5-HT₇ receptor positively coupled to adenylate cyclase activation in human granulosa-lutein cells. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 85(3), 1277–1286. DOI: [10.1210/jcem.85.3.6448](https://doi.org/10.1210/jcem.85.3.6448)

Gershon, E., & Dekel, N. (2020). Newly Identified Regulators of Ovarian Folliculogenesis and Ovulation. *International journal of molecular sciences*, 21(12), 4565. DOI: [10.3390/ijms21124565](https://doi.org/10.3390/ijms21124565)

Hensler, J. (2012). Serotonin in Siegel, G., Albers, R., Price, D., & Brady, S. *Basic neurochemistry: principles of molecular, cellular, and medical neurobiology* (pp. 300 - 321). Academic Press.

Hamilton, K. J., Hewitt, S. C., Arao, Y., & Korach, K. S. (2017). Estrogen Hormone Biology. *Current topics in developmental biology*, 125, 109–146. DOI: [10.1016/bs.ctdb.2016.12.005](https://doi.org/10.1016/bs.ctdb.2016.12.005)

Hillier S. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. *Molecular and cellular endocrinology*, 179(1-2), 39–46. DOI: [10.1016/s0303-7207\(01\)00469-5](https://doi.org/10.1016/s0303-7207(01)00469-5)

Innocenti, F., Cerquetti, L., Pezzilli, S., Bucci, B., Toscano, V., Canipari, R., & Stigliano, A. (2017). Effect of mitotane on mouse ovarian follicle development and fertility. *The Journal of endocrinology*, 234(1), 29–39. DOI: [10.1530/JOE-17-0203](https://doi.org/10.1530/JOE-17-0203)

Irge, E., Halici, Z., Yilmaz, M., Cadirci, E., & Karakus, E. (2016). Evaluation of 5-HT₇ receptor expression in the placentae of normal and pre-eclamptic women. *Clin Exp Hypertens*, 38(2):189-93. DOI: [10.3109/10641963.2015.1081215](https://doi.org/10.3109/10641963.2015.1081215).

Jana, D., Nandi, D., Maiti, R., & Ghosh, D. (2001). Effect of human chorionic gonadotrophin coadministration on the activities of ovarian Delta5-3beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and 17beta-hydroxysteroid dehydrogenase, and ovarian and uterine histology in lithium chloride-treated albino rats. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 15(2), 215–219. DOI: [10.1016/s0890-6238\(01\)00115-0](https://doi.org/10.1016/s0890-6238(01)00115-0)

Jamnongjit, M., & Hammes, S. R. (2006). Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 5(11), 1178–1183. DOI: [10.4161/cc.5.11.2803](https://doi.org/10.4161/cc.5.11.2803)

Karman, B. N., Basavarajappa, M. S., Hannon, P., & Flaws, J. A. (2012). Dioxin exposure reduces the steroidogenic capacity of mouse antral follicles mainly at the level of HSD17B1 without altering atresia. *Toxicology and applied pharmacology*, 264(1), 1–12. DOI: [10.1016/j.taap.2012.07.031](https://doi.org/10.1016/j.taap.2012.07.031)

Koppan, M., Bodis, J., Verzar, Z., Tinneberg, H., & Torok, A. (2004). Serotonin may alter the pattern of gonadotropin-induced progesterone release of human granulosa cells in super fusion system. *Endocrine*, 24(2), 155–159. DOI: [10.1385/endo:24:2:155](https://doi.org/10.1385/endo:24:2:155)

Kehr, J., Ichinose, F., Yoshitake, S., Goiny, M., Sievertsson, T., Nyberg, F., & Yoshitake, T. (2011). Mephedrone, compared with MDMA (ecstasy) and amphetamine, rapidly increases both dopamine and 5-HT levels in nucleus accumbens of awake rats. *British journal of pharmacology*, 164(8), 1949–1958. DOI: [10.1111/j.1476-5381.2011.01499](https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.2011.01499)

Latarjet, M., & Ruiz, A. (2019). *Anatomía humana* (5a ed, pp.1519-1521). Editorial Médica Panamericana.

Lew, R. (2019). Natural history of ovarian function including assessment of ovarian reserve and premature ovarian failure. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynecology*, 55, 2–13. DOI: [10.1016/j.bpobgyn.2018.05.005](https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2018.05.005)

Lenglet, S., Delarue, C., Lefebvre, H., Vaudry, H., & Contesse, V. (2000). Rat glomerulosa cells express functional 5-HT7 receptors. *Endocrine research*, 26(4), 597–602. DOI: [10.3109/07435800009048577](https://doi.org/10.3109/07435800009048577)

Li, N., Zhou, L., Zhu, J., Liu, T., & Ye, L. (2020). Role of the 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase signalling pathway in di-(2-ethylhexyl) phthalate-induced ovarian dysfunction: An in vivo study. *The Science of the total environment*, 712, 134406.

Martín-Cora, F., & Pazos, A. (2004). Autoradiographic distribution of 5-HT₇ receptors in the human brain using [3H] mesulergine: comparison to other mammalian species. *British journal of pharmacology*, 141(1), 92–104. DOI: [10.1038/sj.bjp.0705576](https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0705576)

McCorvy, J., & Roth, B. L. (2015). Structure and function of serotonin G protein-coupled receptors. *Pharmacology & therapeutics*, 150, 129–142. DOI: [10.1016/j.pharmthera.2015.01.009](https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2015.01.009).

Miller, W. & Auchus, R. (2011). The molecular biology, biochemistry, and physiology of human steroidogenesis and its Disorders. *Endocrine Reviews*, 32 (1): 81-151. DOI: [10.1210/er.2010-0013](https://doi.org/10.1210/er.2010-0013)

Miller, W. (2017). Steroidogenesis: Unanswered Questions. *Trends in endocrinology and metabolism: TEM*, 28(11), 771–793. DOI: [10.1016/j.tem.2017.09.002](https://doi.org/10.1016/j.tem.2017.09.002)

Morán, M. J., Ayala, M. E., Gallegos, E., Romero, J., Chavira, R., Damián-Matsumura, P., & Domínguez, R. (2013). Effects of systemic administration or intrabursal injection of serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in rats. *Reproduction, fertility, and development*, 25(8), 1105–1114. DOI: [10.1071/RD12253](https://doi.org/10.1071/RD12253)

Müller, C. P., & Homberg, J. R. (2015). The role of serotonin in drug use and addiction. *Behavioural brain research*, 277, 146–192. DOI: [10.1016/j.bbr.2014.04.007](https://doi.org/10.1016/j.bbr.2014.04.007)

Neilson, L., Andalibi, A., Kang, D., Coutifaris, C., Strauss, J. F., 3rd, Stanton, J. A., & Green, D. P. (2000). Molecular phenotype of the human oocyte by PCR-SAGE. *Genomics*, 63(1), 13–24. DOI: [10.1006/geno.1999.6059](https://doi.org/10.1006/geno.1999.6059)

Nikishin, D., Alyoshina, N., & Shmukler, Y. (2018). Synthesis and Membrane Transport of Serotonin in the Developing Ovarian Follicle of Mouse. *Doklady. Biochemistry and biophysics*, 478(1), 4–7.

Nikishin, D. A., Alyoshina, N. M., Semenova, M. L., & Shmukler, Y. B. (2019). Analysis of Expression and Functional Activity of Aromatic L-Amino Acid Decarboxylase (DDC) and Serotonin Transporter (SERT) as Potential Sources of Serotonin in Mouse Ovary. *International journal of molecular sciences*, 20(12), 3070. DOI: [10.3390/ijms20123070](https://doi.org/10.3390/ijms20123070)

NOM-062-ZOO-1999, N. O. M., & LA PRODUCCION, E. T. P. (1999). Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999: Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Ortega, I., Villanueva, J., Wong, D., Cress, A., Sokalska, A., Stanley, S., & Duleba, A. (2014). Resveratrol potentiates effects of simvastatin on inhibition of rat ovarian theca-interstitial cells steroidogenesis. *J Ovarian Res.* 13; 7:21. DOI: [10.1186/1757-2215-7-21](https://doi.org/10.1186/1757-2215-7-21)

Pawluski, J., Li, M., & Lonstein, J. (2019). Serotonin and motherhood: From molecules to mood. *Frontiers in neuroendocrinology*, 53, 100742. DOI: [10.1016/j.yfrne.2019.03.001](https://doi.org/10.1016/j.yfrne.2019.03.001)

Pai, V., Hernandez, L., Stull, M., & Horseman, N. (2015). The type 7 serotonin receptor, 5-HT 7, is essential in the mammary gland for regulation of mammary epithelial structure and function. *BioMed research international*, 364746. DOI: [10.1155/2015/364746](https://doi.org/10.1155/2015/364746)

Purves, D., Augustine, G., Fitzpatrick, D., Hall, W., LaMantia, A., White, L., Mooney, R., Platt, M. & Klajn, D. (2016). Neurociencia (5a ed, pp. 109-140). Editorial Médica Panamericana.

Quintero-Villegas, A., & Valdés-Ferrer, S. (2019). Role of 5-HT7 receptors in the immune system in health and disease. *Molecular medicine (Cambridge, Mass.)*, 26(1), 2. DOI: [10.1186/s10020-019-0126-x](https://doi.org/10.1186/s10020-019-0126-x)

Richards, J. (2018). The Ovarian Cycle. *Vitamins and hormones*, 107, 1–25. DOI: [10.1016/bs.vh.2018.01.009](https://doi.org/10.1016/bs.vh.2018.01.009)

Ross, M., & Pawlina, W. (2015). Sistema Genital Femenino. En *Histología: Texto y Atlas. Correlación con biología celular y molecular* (7ª ed. pp. 897-912). Lippincott Williams & Wilkins.

Rodríguez, M. (2021). Histología de ovario y tuba uterina. En Manual de Laboratorio de Histología y Embriología (pp. 36-45). Universidad Nacional Autónoma de México.

Robledo, P. (2008). Trastornos Adictivos. Universidad Pompeu Fabra e IMIM. *Elsevier*. 10(3):166-174.

Romero, J., Cárdenas, M., Damián, P., Domínguez, R., & Ayala, M. (2016). Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions. *Reproductive toxicology (Elmsford, N.Y.)*, 59, 80–88. DOI: [10.1016/j.reprotox.2015.12.006](https://doi.org/10.1016/j.reprotox.2015.12.006)

Ruman, J. I., Pollak, S., Trousdale, R. K., Klein, J., & Lustbader, J. W. (2005). Effects of long-acting recombinant human follicle-stimulating hormone analogs containing N-linked glycosylation on murine folliculogenesis. *Fertility and sterility*, 83 Suppl 1, 1303–1309. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2004.12.027](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2004.12.027)

Sadler, T. (2019). Gametogénesis: transformación de las células germinales en gametos masculino y femeninos. En *Langman, Embriología médica*. (pp. 14-18). Lippincott Williams & Wilkins.

Satué, K., Fazio, E., Ferlazzo, A., & Medica, P. (2019). Intrafollicular and systemic serotonin, oestradiol and progesterone concentrations in cycling mares. *Reproduction in domestic animals, Zuchthygiene*, 54(10), 1411–1418. DOI: [10.1111/rda.13545](https://doi.org/10.1111/rda.13545)

Sugimoto, Y., Ohkura, M., Inoue, K., & Yamada, J. (2000). Involvement of the 5-HT (2) receptor in hyperthermia induced by p-chloroamphetamine, a serotonin-releasing drug in mice. *European journal of pharmacology*, 403(3), 225–228. DOI: [10.1016/s0014-2999\(00\)00585-9](https://doi.org/10.1016/s0014-2999(00)00585-9)

Sprague, J., Johnson, J., Schmidt, C. & Nichols, D. (1996). Studies on the mechanism of p-chloroamphetamine neurotoxicity. *Biochem. Pharmacol.*, 52 (8): 1271-1277. DOI: [10.1016/0006-2952\(96\)00482-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00482-0)

Strauss, S., Greve, T., Ernst, E., Fraidakis, M., Grudzinskas, J. & Andersen, C. (2014). Administration of DHEA augments progesterone production in a woman with low ovarian reserve being transplanted with cryopreserved ovarian tissue. *Journal Assist Reprod Genet*, 31: 645-649. DOI: [10.1007/s10815-014-0214-3](https://doi.org/10.1007/s10815-014-0214-3)

Simmler, L., & Liechti, M. (2018). Pharmacology of MDMA- and Amphetamine-Like New Psychoactive Substances. *Handbook of experimental pharmacology*, 252, 143–164. DOI: [10.1007/164_2018_113](https://doi.org/10.1007/164_2018_113)

Schmidt, C. J., & Taylor, V. L. (1987). Depression of rat brain tryptophan hydroxylase activity following the acute administration of methylenedioxymethamphetamine. *Biochemical pharmacology*, 36(23), 4095–4102. DOI: [10.1016/0006-2952\(87\)90566-1](https://doi.org/10.1016/0006-2952(87)90566-1)

Szigeti, B., Winstock, A. R., Erritzoe, D., & Maier, L. J. (2018). ¿Are ecstasy induced serotonergic alterations overestimated for the majority of users? *Journal of psychopharmacology (Oxford, England)*, 32(7), 741–748. DOI: [10.1177/0269881118767646](https://doi.org/10.1177/0269881118767646)

Sprague, J. E., Johnson, M. P., Schmidt, C. J., & Nichols, D. E. (1996). Studies on the mechanism of p-chloroamphetamine neurotoxicity. *Biochemical pharmacology*, 52(8), 1271–1277. DOI: [10.1016/0006-2952\(96\)00482-0](https://doi.org/10.1016/0006-2952(96)00482-0)

Taniguchi, F., Couse, J, Rodriguez, K., Emmen, J., Poirier, D., & Korach, K. (2007). Estrogen receptor-alpha mediates an intraovarian negative feedback loop on thecal cell steroidogenesis via modulation of Cyp17a1 (cytochrome P450, steroid 17alpha-hydroxylase/17,20 lyase) expression. *The FASEB Journal*, 21(2):586-95. DOI: [10.1096/fj.06-6681](https://doi.org/10.1096/fj.06-6681)

Tanaka, E., Nobuyuki, B., Toshida, K., & Suzuki, K. (1993). Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT2 receptor. *Life Sci*, 53 (7): 563–570. DOI: [10.1016/0024-3205\(93\)90713-d](https://doi.org/10.1016/0024-3205(93)90713-d)

Terranova, P., Uilenbroek, T., Saville, L., Horst, D., & Nakamura, Y. (1990). Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles *in vitro*: effects of

experimentally induced atresia. *Journal Endocrinol*, 125 (3):433–438. DOI: [10.1677/joe.0.1250433](https://doi.org/10.1677/joe.0.1250433)

Torres, A. M. R., & Sánchez, A. G. (2008). Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. Revisión. *Revista Mexicana de Ciencias Pecuarias*, 46(2), 159-182.

Thomas, D., Atkinson, P., Hastie, P., Roberts, J., Middlemiss, D., & Price, G. (2002). [3H]-SB-269970 radiolabels 5-HT7 receptors in rodent, pig, and primate tissues. *Neuropharmacology*, 42(1), 74–81. DOI: [10.1016/s0028-3908\(01\)00151-4](https://doi.org/10.1016/s0028-3908(01)00151-4)

Tresguerres, J., & Castillo, C. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófisis-ovárico. *En Fisiología Humana* (3a ed. pp. 1007-1022) McGraw-Hill.

Tzirogiannis, K. N., Kourentzi, K. T., Zyga, S., Papalimneou, V., Tsironi, M., Grypioti, A. D., Protopsaltis, I., Panidis, D., & Panoutsopoulos, G. I. (2014). Effect of 5-HT7 receptor blockade on liver regeneration after 60-70% partial hepatectomy. *BMC gastroenterology*, 14, 201. DOI: [10.1186/s12876-014-0201-2](https://doi.org/10.1186/s12876-014-0201-2)

Uyar, A., Torrealday, S., & Seli, E. (2013). Cumulus and granulosa cell markers of oocyte and embryo quality. *Fertility and sterility*, 99(4), 979–997. DOI: [10.1016/j.fertnstert.2013.01.129](https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.129)

Ventura, E., & Hernández, M. (2019). La esteroidogénesis en el síndrome de ovarios poliquísticos. *Gaceta medica de Mexico*, 155(2), 184-190. DOI: [10.24875/gmm.18003955](https://doi.org/10.24875/gmm.18003955)

Veselá, J., Rehák, P., Mihalik, J., Czikková, S., Pokorný, J. & Koppel, J. (2003). Expression of serotonin receptors in mouse oocytes and preimplantation embryos. *Physiological research*, 52(2), 223–228.

Walther, D., Peter, J., Bashammakh, S., Hortnagl, H., Voits, M., Fink, H. & Bader, M. (2003). Synthesis of serotonin by a second tryptophan hydroxylase isoform. *Science*, 299 (5603), 76. DOI: [10.1126/science.1078197](https://doi.org/10.1126/science.1078197)

Weng, R., Shen, S., Tian, Y., Burton, C., Xu, X., Liu, Y., Chang, C., Bai, Y., & Liu, H. (2015). Metabolomics Approach Reveals Integrated Metabolic Network Associated with Serotonin Deficiency. *Scientific reports*, 5, 11864. DOI: [10.1038/srep11864](https://doi.org/10.1038/srep11864)

Young, J., & McNeilly, A. (2012). Inhibin removes the inhibitory effects of activin on steroid enzyme expression and androgen production by normal ovarian thecal cells. *Journal of molecular endocrinology*, 48(1), 49–60. DOI: [10.1530/JME-11-0134](https://doi.org/10.1530/JME-11-0134)

Zhou, J., Peng, X., & Mei, S. (2019). Autophagy in Ovarian Follicular Development and Atresia. *International journal of biological sciences*, 15(4), 726–737. DOI: [10.7150/ijbs.30369](https://doi.org/10.7150/ijbs.30369)