



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

**Efectos de Administración de p-
Cloroanfetamina en la Secreción de Estradiol y
Estructura del ovario en la rata prepúber**

Tesis

Para obtener el título de

Biólogo

Presenta:

Ascona Vázquez Marisol

Directora de Tesis: **Dra. María Elena Ayala Escobar**

Unidad de Investigación Biología de la Reproducción
L5PB

La presente tesis fue posible gracias al subsidio IN223714
del Programa de Apoyo para la Investigación e Innovación
Tecnológica (PAPIIT)



México D.F. Diciembre del 2012

Noviembre, 2013



**Universidad Nacional Autónoma de
México**

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

**Efectos de Administración de p-Cloroanfetamina en la
Secreción de Estradiol y Estructura del ovario en la rata
prepúber**

Tesis

Para obtener el título de

Biólogo

Presenta:

Ascona Vázquez Marisol

Directora de Tesis: **Dra. María Elena Ayala Escobar**



Realizada en el laboratorio de pubertad de la unidad
de investigación en biología de la reproducción

México D.F. Diciembre del 2012

Noviembre, 2013

Agradecimientos

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su contribución al presente trabajo y por coadyuvar en mi formación y crecimiento.

A todos aquellos que brindaron su apoyo para la culminación de esta etapa: familia, sinodales, profesores, compañeros, amigos...

Gracias.

Desde que el ser humano inició su recorrido por la vida, su principal aspiración fue dejar su marca para la posteridad. Algunos logran que se construyan grandes monumentos en su honor; otros crean importantes industrias o amasan fortunas y otros simplemente contribuyen al pensamiento humano o la esencia del ser, y es con pequeños experimentos que se logran descubrir grandes cosas, este grano de arena tal vez no sea mucho, pero es el comienzo de lo que puedo ofrecer.

Índice

Resumen	i
Introducción	1
Marco teórico	4
<i>Anfetamina</i>	4
<i>Sistema Serotoninérgico</i>	5
<i>Ovario y Funciones</i>	9
Foliculogénesis	10
Esteroidogénesis	14
<i>Serotonina y eje Hipotálamo-Hipófisis</i>	17
<i>Serotonina y Regulación de las Funciones del Ovario</i>	19
<i>p-Cloroanfetamina</i>	20
Justificación	22
Hipótesis	23
Objetivo General	23
Objetivos Particulares	23
Material y Método	24
<i>Animales</i>	24
<i>Sacrificio de Animales</i>	24
<i>Cuantificación de Serotonina y del 5-HIAA</i>	25
<i>Población Folicular</i>	26
<i>Cuantificación de Hormonas Esteroides en Suero</i>	27
<i>Análisis Estadístico de Resultados</i>	27
Resultados	28
<i>Efecto de la administración del vehículo (VH)</i>	28
<i>Efecto de la administración de la p-Cloroanfetamina</i>	32

Sistema serotoninérgico en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario	35
Concentración de hormonas esteroides	37
Población folicular.....	39
Atresia folicular	43
Discusión	45
Conclusiones	51
Bibliografía.....	53
Apéndice A.....	52

Resumen

La serotonina participa en la modulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas y las gonadotropinas, esenciales en la modulación de las funciones del ovario. Sin embargo, las evidencias que señalan la participación del sistema serotoninérgico en la secreción de hormonas esteroides son contradictorias y hoy en día se desconoce su participación en la regulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. Aunado a esto, en la actualidad con fines médicos o recreativos se ha incrementado el uso de fármacos que afectan al sistema serotoninérgico. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la inhibición de la síntesis de serotonina, inducida por la administración de un derivado de las anfetaminas, la p-Cloroanfetamina en el sistema serotoninérgico del hipotálamo-hipófisis-ovario, en el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico y en la concentración de progesterona (P_4), testosterona (T) y estradiol (E_2) en el suero.

A ratas hembras de 30 días de edad se les administró solución salina (0.9%) (VH) ó 10 mg/kg de p.c de p-Cloroanfetamina por vía intraperitoneal. Como grupo de comparación se utilizaron animales sin ningún tratamiento, testigo absoluto (TA). Animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento. En la autopsia se extrajo el cerebro, se disecó el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM), la hipófisis y el ovario derecho, en los que se realizó la cuantificación de la concentración de serotonina y de su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por cromatografía de líquidos de alta presión. En el ovario izquierdo se realizó el análisis de la población folicular y en el suero se evaluó la concentración de progesterona, testosterona y estradiol por radioinmunoanálisis. Los resultados se analizaron estadísticamente.

En comparación con el grupo VH, en el HA y HM de los animales que recibieron p-Cloroanfetamina, disminuyó significativamente la concentración de 5-HT y 5-HIAA en todos los periodos estudiados

En la hipófisis no se observaron cambios significativos en la concentración de serotonina y el 5-HIAA.

En el ovario de los animales que se les administró la p-Cloroanfetamina, no se observaron cambios en la concentración de serotonina en comparación con el grupo con VH y el 5-HIAA únicamente disminuyó a las 120 horas (0.219 ± 0.041 vs. 0.113 ± 0.019 , $p < 0.05$).

La concentración de progesterona disminuyó únicamente a las 48 h después del tratamiento (4.836 ± 1.136 vs. VH 9.402 ± 1.403 , ng/mL de suero, $p < 0.05$), no se modificó la de testosterona y la de estradiol disminuyó significativamente en todos los periodos estudiados.

Cuando se realizó el análisis de la población folicular, se observó el incremento significativo de la atresia en los folículos clase 1, 2 y 3 en los ovarios de los animales que se les administró la p-Cloroanfetamina en comparación con el grupo con VH.

Con base en los resultados antes descritos mostramos que la p-Cloroanfetamina disminuye la actividad del sistema serotoninérgico del hipotálamo y esto se acompaña de la modificación en las funciones del ovario, la esteroidogénesis y el crecimiento folicular.



Introducción

Las anfetaminas son sustancias estimulantes del sistema nervioso que generan cambios físicos y psicológicos. El término anfetaminas engloba un conjunto de sustancias estimulantes tales como: la metanfetamina y 3,4-metilen-dioxi-metanfetamina (éxtasis). Son utilizadas desde los años veinte, principalmente para evitar la fatiga e incrementar la alerta en militares. En 1927, se descubrió que las anfetaminas elevan la presión sanguínea, contraen los vasos sanguíneos, y dilatan los sacos bronquiales, estas propiedades dieron lugar a su comercialización con el inhalador Bencedrina. Tiempo después, apareció la dexanfetamina (Dexedrina). En 1938, se lanzó al mercado la metanfetamina (Methedrina) y, en 1954, el metilfenidato (Ritalin). Hoy en día las anfetaminas son utilizadas para mejorar el rendimiento físico o intelectual, la narcolepsia, la obesidad, la depresión, el trastorno por déficit de atención con hiperactividad (TDAH) en niños, adolescentes y adultos, entre otras condiciones (Brailowsky, 2002).

Las anfetaminas actúan en el sistema nervioso central (SNC), modificando la actividad de algunos sistemas de neurotransmisión, como el serotoninérgico. En relación a este sistema, se ha observado que afectan a diferentes marcadores, tales como: 1) Inhiben la actividad de la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la triptófano hidroxilasa, lo que se refleja en la disminución en la síntesis de la serotonina (5-hidroxitriptamina o 5-HT); 2) Inhiben a la enzima Monoaminoxidasa (MAO), enzima que metaboliza a la serotonina en el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y por lo tanto disminuyen la concentración de este metabolito; 3) Inhiben los receptores a serotonina del tipo 5-HT_{1A} y 5-HT_{2A}. Conjuntamente estos efectos se acompañan a largo plazo de daño en las neuronas serotoninérgicas (Azmitia, 2003; Coskun, 2006; Lorenzo, 2003; Sekerke, 1975; Utrilla, 2000). Es posible que las anfetaminas al actuar en el SNC y modificar la actividad del sistema serotoninérgico, altere aspectos reproductivos, particularmente los



relacionados con la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo o de las gonadotropinas (hormona estimulante del folículo (FSH) y Luteinizante (LH)) por la hipófisis, esenciales en el mantenimiento de la estructura y funciones de las gónadas, eventos esenciales para la reproducción (Johns, 1982; Muñoz-Vargas, 2004; Prieto & Velázquez, 2002; Sirotking & Schaeffer, 1997).

El hipotálamo de la rata contiene serotonina y a la enzima triptófano hidroxilasa. Estos dos marcadores del sistema serotoninérgico son transportados hasta el hipotálamo por un conjunto de fibras serotoninérgicas cuyos somas se ubican en el núcleo del rafe, que se divide en: dorsal (NDR), medial (NMR) y del puente (NPR). Estas fibras que comunican al hipotálamo con el rafe forman el haz medial del cerebro anterior, el tracto ventricular, y la vía del tracto arcuato. También se indica la presencia de cuerpos celulares serotoninérgicos en el hipotálamo aunque no se ha encontrado su distribución exacta (Frankfurt, *et al.*, 1981). Jennes y colaboradores (1982) propusieron una interacción directa entre las fibras serotoninérgicas y los somas o fibras de las neuronas que secretan la GnRH. Aunado a esta evidencia anatómica se ha mostrado que en la rata hembra prepúber de 30 días de edad la serotonina del hipotálamo cuyo origen es el NDR es esencial en la modulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas (Ayala, *et al.*, 1994; Monroy, *et al.*, 2003).

Las terminales nerviosas que liberan serotonina también se han identificado en la hipófisis y se originan en el núcleo del rafe (Calizo, *et al.*, 2011; Guyton, 1994) La presencia de serotonina en esta glándula, posiblemente es un indicador de la participación de la serotonina en la modulación de la secreción de la FSH y LH (Johns, 1982; Papageorgiou & Deneff, 2007). En el ovario también se ha identificado a la serotonina, a las enzimas triptófano hidroxilasa y a la MAO, así como los receptores del tipo 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇ (Dubé y Amireaul, 2007). En la gónada de la hembra, se plantea que la serotonina participa en la modulación de la secreción de hormonas esteroideas (Morán, *et al.*, 2012).



Conjuntamente la información antes mencionada indica que la serotonina participa en la modulación del eje reproductivo, hipotálamo-hipófisis-ovario. Sin embargo, no existe información sobre los efectos de las anfetaminas en la secreción de hormonas esteroides y crecimiento folicular. Por ello, en el presente trabajo se analizaron los efectos de la inhibición de la síntesis de serotonina en los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, inducido por la administración de la p-Cloroanfetamina (pCA) en la síntesis de hormonas esteroides y en el desarrollo folicular en la rata hembra prepúber.



Marco teórico

Anfetaminas

En la denominación de anfetaminas se incluyen todas aquellas sustancias derivadas de la estructura de fenilisopropilamina. Se utilizan con fines terapéuticos bajo prescripción médica para mejorar la salud en general de los individuos por ejemplo en el tratamiento contra la obesidad, o como drogas con fines recreativos, como el 3,4-metilendioxi-N-metilanfetamina (MDMA) también conocido como éxtasis (Conolly, 2000; Huff, 2013; Utrilla, 2000 & Zubaran, 2013).

Las anfetaminas afectan la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión, debido a que modifican su concentración, liberación o recaptura. Incrementan la concentración de dopamina como resultado del bloqueo de su recaptura por la neurona presináptica y de su liberación en la terminal dopaminérgica o bien, son incorporados por las neuronas dopaminérgicas y desplazan a la dopamina de sus depósitos citoplasmáticos. Un efecto similar ejercen en las neuronas noradrenérgicas (Liang & Rutledge 1982; Shoblock, *et al.*, 2003). En la vía serotoninérgica dentro de las primeras 24 horas aumentan la concentración extracelular de serotonina como resultado de su unión a la proteína transportadora de serotonina (la SERT) y evita que la serotonina sea recapturada en la terminal presináptica, como consecuencia aumenta la concentración de serotonina en el espacio sináptico. A largo plazo produce neurodegeneración de las neuronas serotoninérgicas, así como inhibición de la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la triptófano hidroxilasa, conjuntamente estos eventos se acompañan de la disminución en la concentración de serotonina (Kankaanpaa, *et al.*, 1998; Utrilla 2000).

El consumo de las anfetaminas crea tolerancia, el síndrome serotoninérgico, dependencia, sensibilidad o efectos secundarios como son hipertermia, insomnio, movimientos



involuntarios, taquicardia, sudoración, sequedad de boca, retención urinaria, tensión mandibular (Trismo), el rechinar de dientes (Bruxismo) y la midriasis. También, se ha reportado que al modificar al sistema serotoninérgico puede alterar la comunicación neuroendocrina lo que se traduce en alteraciones en la secreción de hormonas por la adenohipófisis, prolactina (PRL), adrenocorticotropa (ACTH) y gonadotropinas (FSH y LH) (Utrilla, 2000).

Sistema Serotoninérgico

La serotonina es una amina biogénica que se encuentra en el sistema nervioso central (SNC), en tejidos y órganos periféricos, como el tracto gastrointestinal y aparato reproductor (ovario, útero y testículos). Se sintetiza a partir del aminoácido triptófano que es hidroxilado por la enzima triptófano hidroxilasa (TPH) y forma el 5-hidroxitriptofano, que por acción de la enzima L-aminoácido aromático descarboxilasa (DDC) forma la serotonina (figura 1). Esta se libera a la hendidura sináptica o es recapturada por la terminal presináptica; una vez recapturada con ayuda de su transportador es desaminada por la enzima monoaminooxidasa (MAO) a 5-hidroxiindolacetaldehído y este se transforma en el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por un aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD. El 5-HIAA es el principal metabolito de la serotonina y es eliminado mediante transporte activo por los plexos coroideos y las células parenquimales cerebrales (figura 2) (Azmitia 2003; Muñoz & Vargas, 2004; Sirotkin & Schaeffer, 1997).

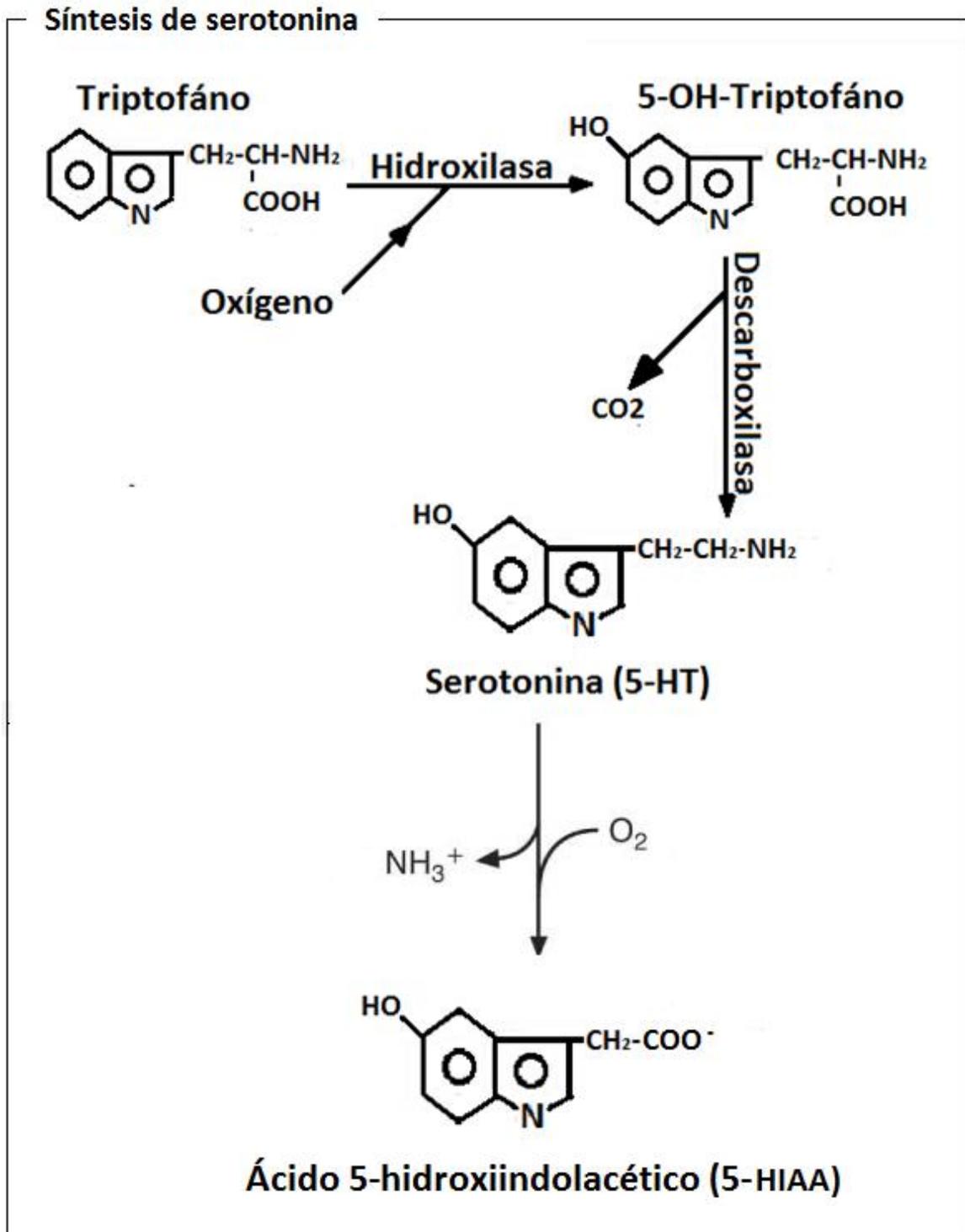


Figura 1: Síntesis de serotonina (Azmitia, 2007).

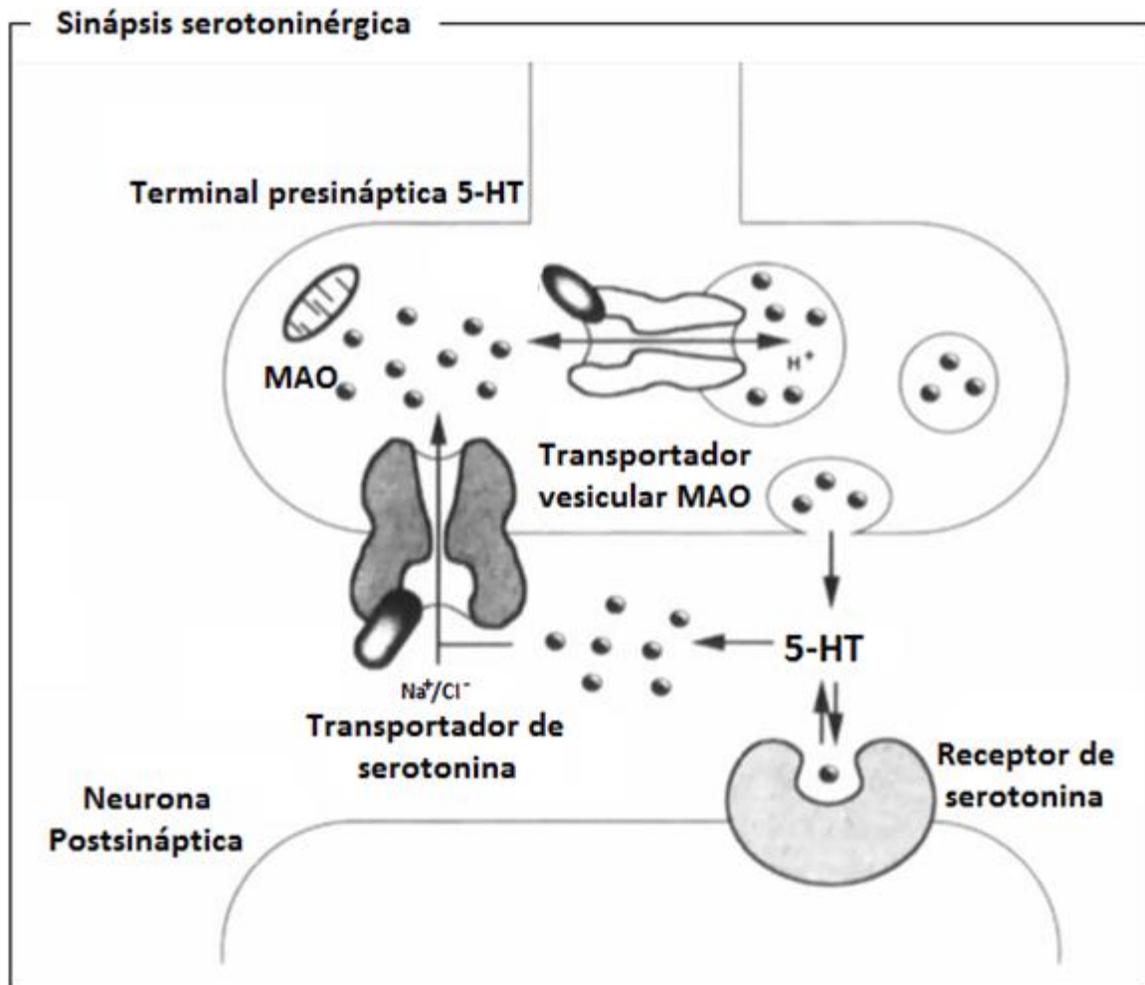


Figura 2: Ciclo de la serotonina (Clark B, Thompson J & Widdrington G, 1972).

La serotonina que se libera a la hendidura sináptica ejerce sus efectos al unirse a sus receptores de membrana. Se han identificado siete tipos de receptores para la amina, 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄ y 5-HT₇. La unión de la amina a su receptor desencadena una cascada de señalización que culmina con la activación de una neurona postsináptica u órgano blanco (Mendoza, 2008; De ahumada, *et al*, 2002; Souccar, 2004).

En el sistema nervioso central la serotonina es producida principalmente por los núcleos del rafe. El núcleo del rafe es un grupo de nueve paquetes de neuronas que se encuentran



en la región del mesencéfalo y siguiendo la clasificación de Dahlström y Fuxe que introdujeron en 1964 se identifican con la letra B seguido de un número del 1 al 9 (Osborne & Hamon, 1998). Las neuronas que conforman el núcleo del rafe envían sus proyecciones serotoninérgicas a diferentes regiones del cerebro por ejemplo el tálamo, núcleo estriado, núcleo accumbens, neo córtex, hipocampo, amígdala, hipotálamo y la eminencia media. Así mismo, algunas neuronas envían sus proyecciones hacia el NDR que expresan noradrenalina (NA), Acetil colina (ACh), ácido gama amino butírico (GABA) y que directa o indirectamente regulan la actividad de las células serotoninérgicas (Calizo, *et al.*, 2011).

Lowry y colaboradores en 2008, por estudios de inmunohistoquímica mostraron que el NDR está conformado por subdivisiones que difieren en la morfología de las neuronas, reconociendo a 6 de ellas: 1) Parte rostral del núcleo dorsal del rafe contiene células serotoninérgicas y no serotoninérgicas como las que producen dopamina (DA), el ácido gama amino butírico (GABA), glutamato (GLU), óxido nítrico (NO), y los neuropéptidos como la sustancia P (SP), factor liberador de corticotropina (CRF), neuropéptido Y (NPY), leu-encefalina, metaencefalina, colesistoquinina (CCK), neurotensina (NT), somatostatina (SOM) y péptido intestinal vasoactivo (VIP). Recibe los axones del hipotálamo y se proyecta hacia el mesencéfalo, ganglios basales, y córtex cerebral; 2) Parte ventral del NDR incluye, predominantemente células serotoninérgicas, células productoras de GABA, galanina y óxido nítrico (NO), recibe proyecciones desde el sistema límbico y la corteza cerebral; y 3) Parte dorsal del NDR comprende neuronas serotoninérgicas, GABAérgicas, galanina, CRF, SOM, y NO, recibe fibras del prosencéfalo basal (BFB) y córtex cerebral, proyectándose hacia el hipotálamo y sistema límbico; 4) Alas Laterales del NDR incluyen la parte ventrolateral (DRNVL) y el adyacente ventrolateral periacueductal gris (VLPAG). El conjunto de DRNVL/VLPAG comprende neuronas serotoninérgicas, así como un gran número de células GABAérgicas. Esta región recibe aferentes desde el mesencéfalo, el hipotálamo, sistema límbico y proyecta hacia el mesencéfalo, el hipotálamo, y tálamo; 5)



La parte caudal del NDR contiene principalmente células 5-HT, también CCK, encefalina, el NPY, SOM, y las células SP, recibe fibras del rombencéfalo, mesencéfalo, hipotálamo, tálamo, y córtex cerebral y envía proyecciones hacia el tálamo y sistema límbico; 6) Parte Interfascicular de la NDR incluye solo células serotoninérgicas. Aunque no se sabe con certeza se ha descrito que sus proyecciones alcanzan el tálamo, sistema límbico, y córtex cerebral (Kanno, *et al*, 2008; Monti, 2010; Osborne & Hamon, 1998). Las neuronas no serotoninérgicas están presentes y se producen en número igual o superior a las neuronas serotoninérgicas en los núcleos del rafe NDR y NMR. La mayoría de las neuronas no-serotoninérgicas se distribuyen diferencialmente dentro del NDR, mientras que en el NMR la distribución de las células es menos clara. Se especula que los neurotransmisores no serotoninérgicos se localizan con los serotoninérgicos para que ambos puedan ser liberados dentro del rafe y en las zonas donde el rafe envía su inervación (Calizo, *et al.*, 2011).

Se considera que existen dos sistemas serotoninérgicos anatómica y funcionalmente diferentes que envían sus proyecciones hacia el cerebro anterior, que se diferencian por: 1) La morfología de los axones, los que se origina en el NDR son finos con varicosidades pequeñas y los que provienen del NMR son axones esféricos con varicosidades gruesas; 2) Dos tipos de axones terminales morfológicamente distintos; y 3) Propiedades farmacológicas, en relación a este aspecto, los axones serotoninérgicos finos que se originan en el NDR son más vulnerables a los efectos de los derivados de las anfetaminas, como la p-Cloroanfetamina, mientras que los axones serotoninérgicos provenientes del NMR son más resistentes a estos fármacos (Mamounas *et al*, 1991).

Ovario y Funciones

El ovario es un órgano ovoide ligeramente aplanado, en humano sus dimensiones son de 3 cm de longitud, 1.5 cm de ancho y 1cm de espesor. Está suspendido por el ligamento ancho del útero en un pliegue del peritoneo denominado mesoovario. El ovario está



recubierto por un epitelio germinal cúbico aplanado, que se apoya en una capa de tejido conjuntivo denso, la túnica albugínea. Por debajo de ésta se encuentra la corteza del ovario, que contiene los folículos ováricos en diversos estadios de desarrollo. Por debajo de la corteza está la médula, zona central del tejido conjuntivo del ovario formada por fibras de colágeno, musculares lisas, fibroblastos, arterias y venas, de las que se originan ramas que se dirigen a la corteza (Fawcett, 2005).

El ovario tiene dos funciones principales el crecimiento y maduración del folículo (foliculogénesis), que culmina con la ovulación y la producción de hormonas esteroides (esteroidogénesis).

Foliculogénesis: Es el proceso formación y maduración que experimenta el folículo ovárico hasta su ovulación o atresia. Algunos folículos inician su transformación de folículos primordiales a folículos primarios al aproximarse a la pubertad, éstos se caracterizan por tener una capa de células cúbicas que rodean al ovocito. Un grupo de folículos primarios entran en una fase de rápido crecimiento en cada ciclo y constituyen los folículos en crecimiento, que se caracterizan porque el ovocito es rodeado por varias capas de células de la granulosa, lo que conduce al aumento en el diámetro del folículo. Conforme el folículo crece, se forma el antro entre las células de la granulosa, que es una cavidad llena de líquido que desplaza al ovocito a un polo del folículo en desarrollo. El ovocito es rodeado de varias capas de células de la granulosa, a esta agrupación de células que rodean al ovocito y que se proyecta hacia el antro se le denomina cumulus oophorus. En esta etapa de desarrollo el folículo se denomina folículo antral o en crecimiento. Durante el crecimiento del folículo, las células de la granulosa son rodeadas por células del estroma que forman la teca folicular, que se divide en interna y externa. La primera recibe un gran aporte de vasos sanguíneos y posee receptores para la LH y la teca externa es menos vascularizada. El antro del folículo almacena el líquido folicular, que contiene



hormonas esteroideas, factores de crecimiento, noradrenalina y GnRH entre otros componentes (Figura 3) (Bloom & Fawcett, 2003; Knobil & Neill's, 2006).

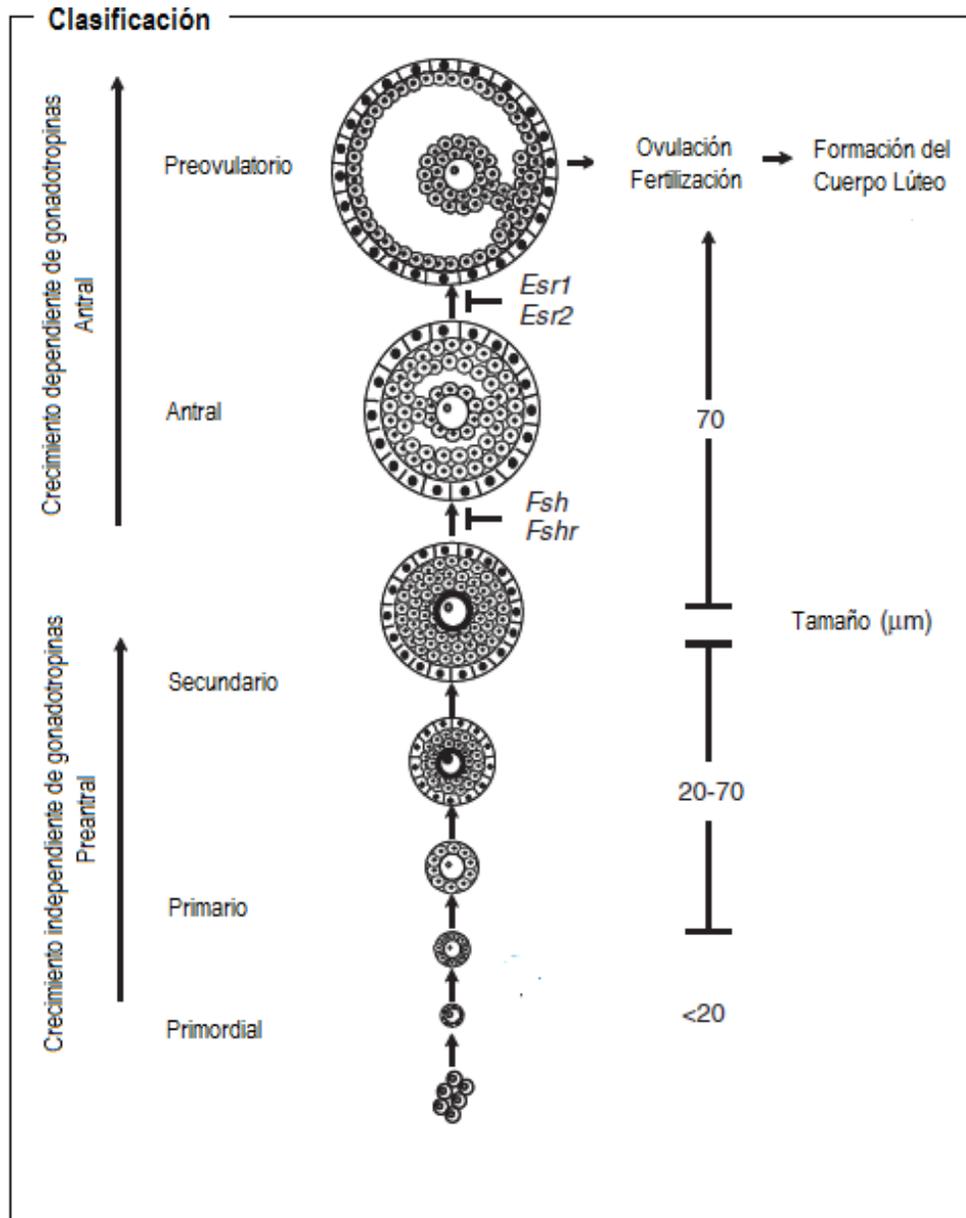


Figura 3: Clasificación de los folículos de rata. En dirección ascendente se ilustra el crecimiento de un folículo desde el postnatal hasta el preovulatorio resaltando la participación de la hormona folículo estimulante (FSH) y su receptor (FSHR) así como los receptores a estradiol (Esr1 y Esr2) (Modificado de Knobil & Neill's, 2006).



En el ovario se presentan cambios cíclicos en su estructura que son regulados por la FSH y LH. La FSH favorece el desarrollo y maduración folicular, ya que estimula la proliferación de las células de la granulosa y estimula la formación de los receptores de LH. Las células de la teca interna poseen los receptores a la LH, hormona que es esencial para la síntesis de testosterona, ya que promueve la producción de andrógenos para proporcionar el sustrato necesario para la aromatización a estrógenos. En los días previos a que se lleve a cabo la ovulación se incrementa la producción de la FSH y LH, pico preovulatorio de la secreción de gonadotropinas, lo que desencadena la maduración final del folículo y su ruptura con la liberación del ovocito, ovulación. El estrógeno aumenta el número de receptores de FSH, así como su sensibilidad a esta hormona en las células de la granulosa. Cuando disminuye la transformación de los andrógenos a estrógenos, conduce a la acumulación de la testosterona en el antro folicular y como consecuencia se induce la apoptosis de las células de la granulosa y la atresia del folículo (Fawcett, 2003; Takagi, *et al.* 2007; Yen, *et al.* 1999).

En un ovario, en cada ciclo uno o varios folículos que iniciaron su crecimiento se vuelven dominantes y aumentan de tamaño (alcanzando un diámetro de 20mm), mientras los demás folículos antrales presentan atresia folicular (Fawcett, 2005). Aparece el estigma o mácula pelúcida en la superficie del folículo maduro. Se adelgaza la teca y la túnica albugínea suprayacente y a través de esta capa sobresale una pequeña vesícula translúcida, que se rompe a los pocos minutos de haberse formado para liberar al óvulo acompañado de las células del cumulus oophorus. El óvulo pasa entonces al oviducto para su transporte hasta el útero. Este proceso se denomina ovulación (Bloom, 2003). La LH en esta etapa reanuda la meiosis, conduce a la expansión del cumulus oophorus a una mayor luteinización de células de la granulosa, promueve la síntesis de prostaglandinas y del activador del plasminógeno necesario para la ruptura folicular (Yen, *et al.* 1999).



Después de la ovulación, la pared del folículo se colapsa y forma numerosos pliegues, las células de la granulosa y de la teca interna se hipertrofian, acumulan gotas de lípidos y se convierten en células luteínicas. Con estos cambios se constituye el cuerpo lúteo. Si no hay fecundación, se produce la regresión del cuerpo lúteo en nueve días aproximadamente. Las células luteínicas entran en apoptosis y los macrófagos que las rodean fagocitan los residuos dejando una cicatriz denominada cuerpo albicans, que persiste durante varios meses. Si existe fertilización del óvulo se produce la implantación en el útero, el cuerpo lúteo persiste durante los dos primeros meses de la preñez (Bloom, 2003; Silbernagl, 2009; Takagi, *et al.* 2007).

La fase luteínica se caracteriza por un aumento de la progesterona bajo la influencia de la LH por dos mecanismos: 1) La inducción de receptores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que permite un aumento de la captación de colesterol, el sustrato para la producción de progesterona; 2) un aumento de la expresión del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) que codifican para la síntesis de la P_{450} y la 3β -hidroxiesteroideshidrogenasa, enzimas necesarias para la síntesis de progesteronas.

El destino de los folículos en crecimiento (crecimiento o atresia) depende del destino de las células dentro de él (es decir, la proliferación, la diferenciación, o la apoptosis). La apoptosis de las células de la granulosa es la base celular de la atresia folicular en el ovario. Ya sea que un folículo en desarrollo continúa creciendo o sufra atresia es determinado por la expresión relativa y la acción de la muerte celular y reguladores de supervivencia en el ovario. Aunque la FSH es un factor de supervivencia celular bien establecido, no es el único que participa en el rescate de las células de la granulosa de entrar en apoptosis y evitar la atresia folicular, también pueden participar factores tales como los estrógenos, factores de crecimiento como el factor de crecimiento insuloide (IGF-I) y el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), genes pro y anti-apoptóticos y citosinas (Hongmei, *et al.*, 2006). Se puede definir a la atresia como el proceso que



conduce a la pérdida o eliminación de la mayoría de los folículos antes de que estos lleguen a liberar su ovocito (ovulación). La apoptosis y atresia, son procesos fundamentales en las etapas perinatales y reproductivas de los organismos, la atresia se identifica por cambios morfológicos e histológicos en el folículo, como son: núcleos picnóticos y fragmentación nuclear en las células de la granulosa, desprendimiento de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz intercelular, desprendimiento del complejo cumulus-ovocito y en algunos casos hipertrofia de las células de la teca. Además, ocurren procesos bioquímicos como la reducción en la síntesis y cantidad de ácido desoxirribonucleico (ADN) en las células de la granulosa, pérdida de uniones comunicantes y de los receptores a gonadotropinas, así como la disminución en la síntesis y expresión de ARNm para aromatasas y receptores a gonadotropinas. En este proceso destaca el aumento en la expresión de genes como el de las proteínas unidoras del Factor de Crecimiento Insulinoide (IGBPs), el de la glicoproteína -2-sulfatada (TRPM-2), el de una aspartil endopeptidasa, la catepsina-D y el del receptor para la angiotensina II. Además, en la atresia participan enzimas lisosomales (fosfatasa ácida y glucosaminidasa), con actividad anti-tripsina, las involucradas en la remodelación tisular como colagenasas, gelatinasas, Pz-peptidasa y el activador del plasminógeno, entre otras. La presencia de núcleos picnóticos y cariorrexis en las células de la granulosa y teca de folículos atresicos, así como estudios bioquímicos posteriores que demostraron la fragmentación internucleosomal del ADN en estas células, han permitido conocer que la apoptosis es el tipo de muerte preponderante en la atresia, aunque no el único (Flores, *et al.*, 2005; Matsuda, *et al.*, 2012; Rosales & Guzmán, 2008).

Esteroidogénesis: El ovario secreta hormonas esteroides, principalmente la progesterona, estrógenos y andrógenos (Speroff, 1999). Las hormonas esteroides se sintetizan a partir del colesterol. El aporte de colesterol al folículo y al cuerpo lúteo, son las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o alta densidad (HDL). El ingreso de LDL a la célula se produce por endocitosis mediada por un receptor. El destino del colesterol intracelular



es la esterificación con ácidos grasos para formar colesterol-éster y almacenarse como gotas de lípidos, o bien, ser transportado al interior de la mitocondria en donde inicia la síntesis de hormonas esteroides (Vega, 1997).

En la membrana interna de la mitocondria el colesterol se transforma a pregnenolona por acción de la enzima citocromo P_{450SCC} . A partir de la pregnenolona se sintetizan las demás hormonas esteroides, esto puede ser por dos vías diferentes dependiendo de las enzimas que actúen. En la vía Delta 5, actúa la enzima $3\beta\text{-DH}\Delta^{4,5}$ -isomerasa que da lugar a la progesterona, y ésta a la 17-OH progesterona por medio de la enzima P_{450c17} , la enzima 17,20 liasa sintetiza la androstenediona y si sobre esta actúa la enzima aromatasa seguida de la 17-ketoreductasa da lugar al estradiol, si actúa la 17-ketoreductasa directamente sobre la androstenediona se crea la testosterona (Vega, 1997). En la vía Delta 4, la pregnenolona actúa la enzima P_{450c17} originando la 17-OH pregnenolona, que pasa a dehidroepiandrosterona por la enzima 17,20 liasa, y ésta a androstendiol por la 17-ketoreductasa, misma que pasa a testosterona por la $3\beta\text{-DH}\Delta^{4,5}$ -isomerasa, si sobre esta actúa una reductasa (5- α reductasa) pasa a dihidrosterona y si actúa una aromatasa se sintetiza estradiol. La expresión de la P_{450} aromatasa se da en respuesta a estimulación de las células de la granulosa por la FSH (Figura 4) (Silbernagl, 2009; Vega, 1997).

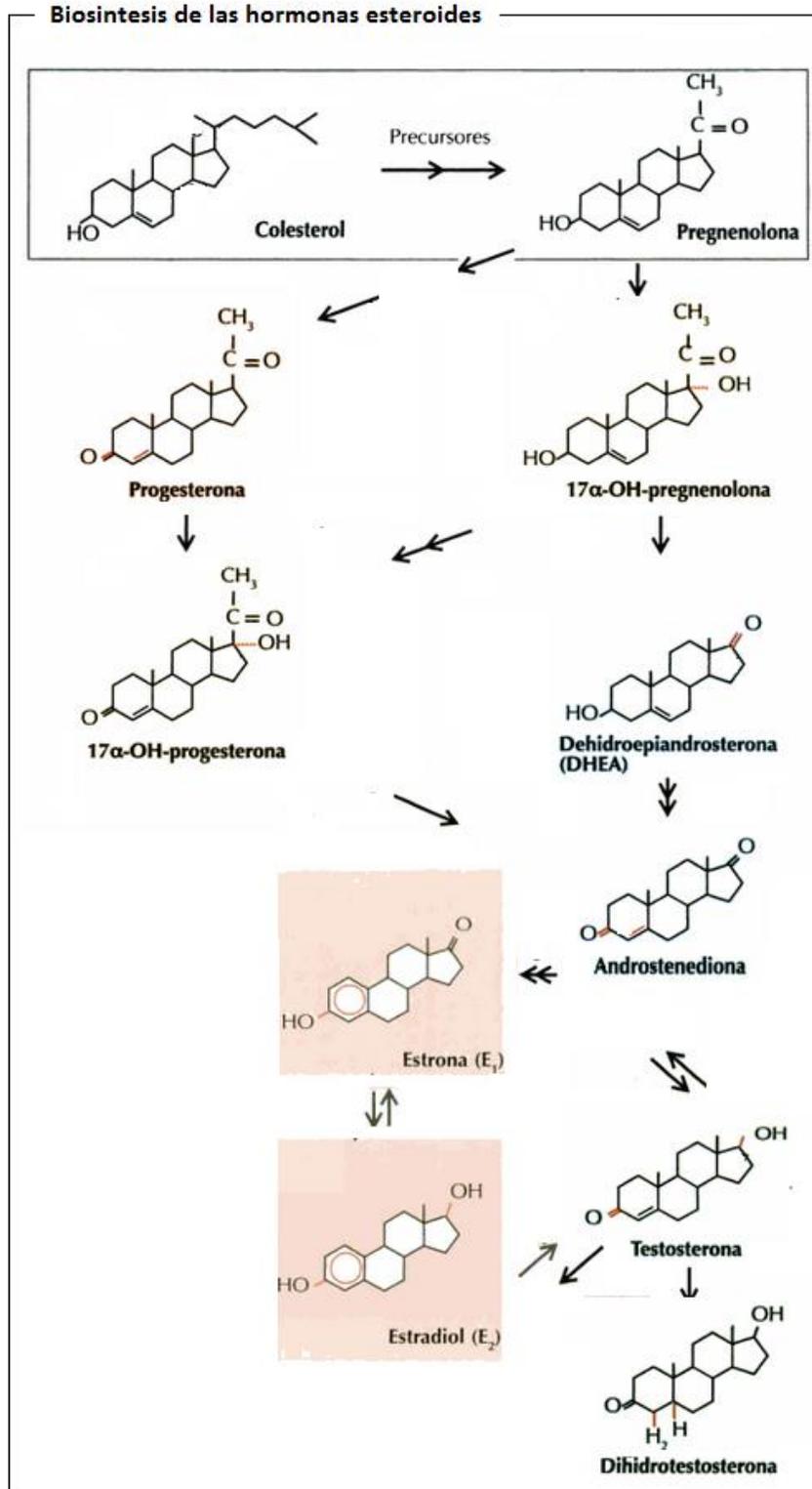


Figura 4: Síntesis de hormonas esteroides (Silbernagl, 2009)



Serotonina y eje hipotálamo-hipófisis

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, por delante del quiasma óptico y por detrás los cuerpos mamilares, por arriba limita con el tálamo y por debajo con la hipófisis. Conjuntamente con esta última estructura regula diversas glándulas endocrinas (Ramírez, 2006). Funcionalmente el hipotálamo participa en la regulación del mantenimiento del medio interno (homeostasis) (Ramírez, 2006), así como la conducta y las funciones reproductivas, debido a que modula la secreción de gonadotropinas, (FSH y LH) por intermedio de la GnRH (Neil, 2005; Pallardo, 2010).

En el área preóptica hipotalámica anterior se encuentra un grupo de neuronas denominadas GnRHérgicas, debido a que secretan el péptido GnRH (Herbison, 2006). Este péptido se libera en la eminencia media y es transportado por una serie de vasos sanguíneos que se origina en la parte baja del hipotálamo, la eminencia media y terminan en la adenohipófisis, y constituye el sistema porta hipotalámico hipofisiario. Al llegar a la adenohipófisis, la GnRH se une a sus receptores de membrana en los gonadotropos y estimula la síntesis de las FSH y LH, las que salen a circulación sanguínea y actúan en su órgano blanco específico: el ovario en la hembra y el testículo en el macho, en donde regulan su funcionamiento (Cravioto, *et al*, 1997; Neil, 2005).

La secreción de la GnRH por el hipotálamo es regulada por diferentes sistemas de neurotransmisión como son las endorfinas, GABA, DA, NA y serotonina entre otros, y por factores no esteroideos producidos por las gónadas, la inhibina y la activina (Prieto & Velázquez, 2002). En el área preóptica hipotalámica anterior se han identificado contactos entre el soma de las neuronas que secretan el factor liberador de las gonadotropinas (GnRH) y la terminal de las neuronas serotoninérgicas y; en la eminencia media existen contactos entre las terminales de ambas neuronas (Wright & Jennes, 1993; Kis & Halász, 1984).



A la serotonina se le atribuye una función dual en la regulación de la secreción de las gonadotropinas. Se sugiere que ejerce un efecto inhibitorio en la regulación de la secreción de la LH al actuar en el hipotálamo basal medial (MBH) y estimulante cuando regula a las neuronas GnRHérgicas que se localizan en el área preóptica (Gouveia & Celso, 2004; Wada, *et al.* 2006).

En la rata hembra prepúber, cuando se estimula al sistema serotoninérgico del hipotálamo por la administración de serotonina se incrementa la secreción de LH, efecto que no se observa en el macho (Pinilla, *et al.*, 2003). Un efecto opuesto se observó cuando a ratas hembras y machos prepúberes de 20 días de edad se les inyectó un inhibidor de la síntesis de serotonina, la p-clorofenil alanina metil éster y tres días después el ácido α -amino-3-hydroxy-5-methylisoxazole-4-propionic (AMPA), en ambos sexos disminuyó la concentración de FSH y la de LH no se modificó (Pinilla, *et al.*, 2003).

En la rata hembra prepúber de 30 días de edad, la inervación serotoninérgica del hipotálamo parece ser esencial en la modulación de la secreción de las gonadotropinas y como consecuencia en la primera ovulación, debido a que cuando se administra un neurotóxico selectivo de las fibras serotoninérgicas, la 5,6-dihidroxitriptamina, en el NDR, se bloquea la ovulación y en el ovario se incrementa la atresia folicular (Monroy, *et al.*, 2003).

Estos efectos diferenciales que ejerce la serotonina en la regulación de la secreción de las gonadotropinas dependen del medio ambiente esteroide, de la edad y del sexo del animal, del tipo de receptor que se expresa en el momento del estudio, así como del método usado (Battista & Condon, 1986).

Se ha reportado que la serotonina afecta directamente e indirectamente el funcionamiento de la hipófisis, de manera directa lo hace a través de receptores situados



en las células endocrinas; indirectamente lo hace a través de proyecciones neuronales provenientes del NDR y NMR que inervan los núcleos del hipotálamicos que albergan los somas y terminales de las neuronas GnRHérgicas. En forma directa, fibras nerviosas serotoninérgicas que se originan en el rafe magnus y penetran junto con los vasos sanguíneos que irrigan a los gonadótropos posiblemente modifican la disponibilidad de la GnRH para el gonadótropo y como consecuencia la secreción de las gonadotropinas: También se ha mostrado que la hipófisis convierte el triptófano en serotonina, cuando a ratas hembra prepúberes de 30 días de edad se les administra el 5-hidroxitriptofano por vía sistémica, en la hipófisis se incrementa la concentración de serotonina 60 minutos después de la administración del precursor (Johns, *et al*, 1982; Kondo, *et al*, 1994; Papageorgiou & Deneff, 2007; Saland, 2001)

Serotonina y Regulación de las Funciones del Ovario

La serotonina además de encontrarse en el hipotálamo y la hipófisis, también se le ha identificado en algunos componentes del aparato reproductor de la hembra, los oviductos, útero y ovarios. En el ovario, la fuente de serotonina son los mastocitos, las plaquetas y las células de la granulosas que rodean al ovocito, ya que se sugiere que estas la sintetizan (Sirotkin & Schaeffer, 1997). En el ovario de ratón específicamente en las células del cumulus y en el ovocito, por estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado la presencia de algunos marcadores del sistema serotoninérgico como son: 1) La triptófano hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de serotonina; 2) Los receptores a serotonina 5-HT₁ y 5-HT₇; y 3) La proteína transportadora de la serotonina, la SERT (Dubé & Amireault, 2007). Estas evidencias llevan a sugerir que la serotonina en el ovario se encuentra implicada en la regulación de sus funciones.

En el ovario, la serotonina participa en la regulación de la esteroidogénesis y como consecuencia, posiblemente está implicada en la regulación del crecimiento y maduración del folículo (Morán, *et al*, 2012; Dubé & Amireault, 2007; Sirotkin & Schaeffer, 1997).



En estudios *in vivo* e *in vitro* en los que se han empleado agonistas o antagonistas de los receptores a serotonina del tipo 5-HT₁ y 5-HT₂, se ha mostrado la participación de esta amina en la esteroidogénesis por el ovario (Schmidth, *et al*, 1988). Cuando células de la granulosa se mantiene *in vitro*, y se le adiciona serotonina al medio de cultivo, se estimula la síntesis de progesterona y estradiol. El efecto estimulante de la serotonina es bloqueado por la adición de propanolol (un antagonista de los receptores β-adrenérgicos), lo cual permite sugerir que la serotonina actúa en las células de la granulosa y regula la secreción de estradiol (Bódis, *et al*, 1992).

***P*-Cloroanfetamina**

La *p*-Cloroanfetamina es un análogo clorado de la anfetamina que induce selectivamente alteraciones bioquímicas y estructurales en el sistema serotoninérgico en el SNC, debido a que atraviesa las barreras orgánicas por su liposolubilidad, especialmente la barrera hemato-encefálica (Lorenzo, 2003; Berger, 1992; Sprague, 1996).

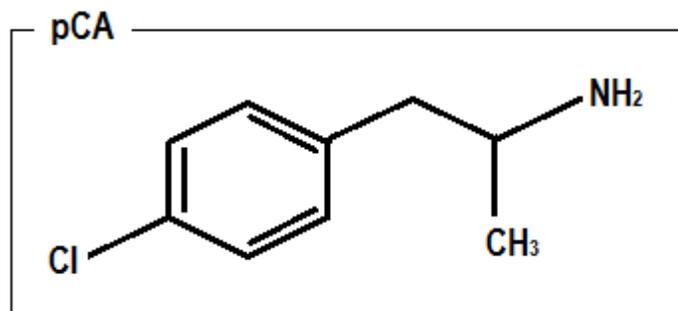


Figura 5: Estructura de la *p*-Cloroanfetamina

En el modelo de la rata se ha mostrado que la *p*-Cloroanfetamina induce alteraciones en algunos marcadores del sistema serotoninérgico; concentración de serotonina (5-HT), concentración del metabolito de la 5-HT, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA); actividad de la enzima triptófano hidroxilasa y densidad de los lugares de recaptura de serotonina en las terminales serotoninérgicas (Lorenzo, 2003; Sekerke, 1975).



En la rata, la administración de p-Cloroanfetamina a corto plazo, a las 24 horas induce el aumento en la concentración de serotonina, debido a que se afectan los depósitos serotoninérgicos liberando a la hendidura sináptica la serotonina acumulada en la neurona presináptica. Posteriormente disminuye la concentración de serotonina, su metabolito y la actividad de la triptófano hidroxilasa. Dos semanas después de la inyección de la p-Cloroanfetamina disminuye la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa en un 59 % y la concentración de serotonina en el cerebro medio, hipocampo y cuerpo estriado en un 53 % (Sanders & Bush, 1972). Treinta días después de la administración de la p-Cloroanfetamina se observa recuperación en la actividad de la triptófano hidroxilasa y la concentración de serotonina se restablece después de los 60 días. La recuperación de la concentración de serotonina es más lenta en comparación con la actividad de la triptófano hidroxilasa debido a la neurodegeneración de las neuronas serotoninérgicas. Se sugiere que la neurotoxicidad de la p-Cloroanfetamina en las neuronas serotoninérgicas no es causada directamente por la anfetamina, sino por la formación de metabolitos que causan estrés oxidativo, la 5-6 ó 5-7-dihidroxitriptamina, el 4-5 dihidroxitriptamina, el 5-hidroxiindol o la 6-hidroxidopamina, los cuales se forman a partir de una dihidroxilación en la amina antes de ser metabolizada y estos actúan como fuente de radicales libres responsables de la neurodegeneración de las terminales serotoninérgicas que se observa a largo plazo (Baumgarten & Lachenmayer, 2004; Berger, 1992; Colado, 1997; Lorenzo, 2003; Sanders & Bush, 1972; Sanders & Bush, *et al*, 1974).



Justificación

En la actualidad existe el uso indiscriminado de anfetaminas ya sea como drogas recreacionales o para tratar algún padecimiento como el sobre peso o el trastorno por déficit de atención con hiperactividad. Estos fármacos modifican la actividad de diferentes sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico, debido a que disminuyen la concentración de serotonina e inducen degeneración de las neuronas serotoninérgicas en el SNC. Así mismo, se ha mostrado que la serotonina participa en la modulación de la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y como consecuencia en el mantenimiento de la estructura y funcionamiento del ovario en la etapa prepúber. Ésta amina, también se encuentra en la hipófisis y en el propio ovario, en donde posiblemente modula su funcionamiento. Existen evidencias experimentales en las que se muestran los efectos de las anfetaminas en el sistema serotoninérgico, sin embargo hasta el momento no se han estudiado los efectos secundarios de estos fármacos en el aspecto reproductivo. Por ello, en el presente trabajo se analizaron los efectos de la administración de un derivado de las anfetaminas, la p-Cloroanfetamina, en el sistema serotoninérgico del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en la estructura del ovario, población folicular y en la secreción de progesterona, testosterona y estradiol.



Hipótesis

La serotonina ejerce un efecto estimulante en la regulación de las funciones del ovario al actuar en los tres componentes del eje reproductivo, hipotálamo-hipófisis, gónada. Por ello, la inhibición de la síntesis de serotonina en los componentes de este eje se traducirá en modificaciones en la estructura del ovario, crecimiento folicular y en la disminución de la secreción de hormonas esteroides.

Objetivo General

Analizar los efectos de la administración de la p-Cloroanfetamina (PCA) en el sistema serotoninérgico del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, en la estructura del ovario y en la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en el suero de la rata hembra prepúber.

Objetivos Particulares

- ♀ Cuantificar la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario de la rata hembra prepúber tratada con p-Cloroanfetamina.
- ♀ Evaluar la actividad del sistema serotoninérgico del hipotálamo en la rata hembra prepúber tratada con p-Cloroanfetamina.
- ♀ Analizar el crecimiento folicular en el ovario de ratas hembras prepúberes tratadas con p-Cloroanfetamina.
- ♀ Cuantificar la concentración de progesterona y estradiol en el suero de rata hembras prepúberes tratadas con p-Cloroanfetamina.



Material y Método

Animales

Se utilizaron ratas hembras de 30 días de edad, Long Evans de la cepa CIIZ-V, mantenidas en periodos de luz oscuridad controlados, 14hrs luz: 10hrs oscuridad, sin restricciones de agua o alimento. Las ratas se distribuyeron al azar en los siguientes grupos experimentales:

- I. **Grupo control absoluto** (sin ningún tipo de manipulación).
- II. **Grupo vehículo**, se les administró solución salina al 0.9% por vía intraperitoneal.
- III. **Grupo fármaco**, se les administró p-Cloroanfetamina en una dosis de 10mg/kg disuelta en solución salina al 0.9 % por vía intraperitoneal.

La administración de solución salina y p-Cloroanfetamina se realizó entre las 09:00 a 09:15 horas. Grupos de animales tratados con vehículo o con p-Cloroanfetamina se sacrificaron a las 48, 72, 96 ó 120 horas posteriores al tratamiento. Grupos de animales testigo absoluto se sacrificaron en los periodos antes mencionados.

Sacrificio de Animales

Los animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron por decapitación entre las 13:00 y 14:00 horas. En el momento del sacrificio se colectó la sangre del tronco, se dejó coagular por 20 minutos, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos, el suero se separó del botón y se almacenó en tubos ependorf a -20°C para la posterior cuantificación de progesterona, testosterona y estradiol por la técnica de radioinmunoanálisis.



Al momento del sacrificio se extrajeron la hipófisis, el cerebro y el ovario derecho, se sumergieron en solución salina (0.9%) con la finalidad de eliminar el exceso de sangre (en el caso del ovario solo se eliminó la mayor cantidad de grasa) y se congelaron a 72°C, posteriormente se realizó la disección del hipotálamo anterior y medio siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos (2007). Todas las muestras biológicas se almacenarán a -72°C para la posterior cuantificación de serotonina y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), por la técnica de cromatografía de líquidos de alta precisión (HPLC).

El ovario izquierdo se disecó y se fijó en el líquido de Bouin, posteriormente se procesó para la evaluación de la población folicular, siguiendo los criterios descritos por Morán y colaboradores (2012).

Cuantificación de Serotonina y del 5-HIAA

Previo a la cuantificación de serotonina y su metabolito, el hipotálamo anterior y medio, ovario derecho e hipófisis se pesaron, los ovarios se homogenizaron en 300 µL de ácido perclórico (HCl_3O_4) al 0.1 N (J.T. Baker chemicals USA), mientras que la hipófisis y el hipotálamo anterior y medio se homogenizaron en 150 µL de HCl_3O_4 . Posteriormente las muestras se centrifugaron a 12000 rpm/min durante 30 minutos a -4°C. El sobrenadante de las muestras de hipotálamo y ovario se filtró a través de filtros de celulosa de tamaño de poro 0.45µm y se inyectaron 20 µL al sistema de cromatografía de líquidos y los sobrenadante de las hipófisis se inyectaron directamente al equipo de cromatografía.

El sistema de cromatografía consiste de una bomba isocrática (Modelo L 250, Perkin Elmer), una válvula de inyección (Reodine modelo 7125 con una capacidad de 20µL, una precolumna de sílica (3.5 cm x 4.6mm) y una columna de C-18 fase reversa (25 cm x 4.6 mm) acoplada a un detector electroquímico amperométrico LC-4C (Bioanalytical System Inc. USA) acoplado a un inyector Nelson 1020 (Perkin Elmer). Los datos son procesados y



cuantificados por un integrador, el cual identifica la serotonina y a su metabolito por el tiempo de retención del estándar y realiza el cálculo de su concentración, comparando el área debajo de la curva de las muestras problema, con el área de las muestras estándar. La concentración de serotonina y del 5-HIAA se expresa en ng/mg de tejido.

Población Folicular

El ovario izquierdo de cada animal se fijó en Bouin durante 24hr, posteriormente se retiró el fijador y se realizaron lavados con alcohol 70 % (J.T. Baker chemicals, USA) hasta retirar el exceso de fijador. Posteriormente se deshidrató e incluyó en parafina. Se realizaron cortes seriados de ovario de 10µm de grosor en el micrótopo, los cortes se colocaron en portaobjetos con albumina y posteriormente se colocaron a una temperatura de 32°C durante 8 días. Los cortes se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina y se cubrieron con bálsamo de Canadá y cubreobjetos para el posterior análisis de la Población folicular.

En todos los folículos en los que se observaron el ovocito con su núcleo y nucléolo bien definidos se midió el diámetro mayor (D1) y el perpendicular al primero (D2) con la ayuda de un microscopio y un ocular micrométrico y se calculó el diámetro promedio con la siguiente relación:

$$\frac{\text{Diámetro 1} + \text{Diámetro 2}}{2}$$

Con base en el diámetro promedio de los folículos se clasificaron en:

- Clase 1: pequeños (<200µm);
- Clase 2: medianos (200-400µm) y;
- Clase 3: preovulatorios (>400µm).

También se realizó el análisis del estado de los folículos, si eran sanos o presentan alguna de las siguientes características de atresia folicular: picnosis de las células de la granulosa,



descamación de las células de la granulosa en el antro del folículo, engrosamiento de la teca o alteración del ovocito (Rosales & Guzmán, 2008).

Cuantificación de Hormonas esteroideas en Suero.

La concentración de progesterona, testosterona, y 17β estradiol en el suero se cuantificó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, con un kit Coat-A-Count, USA (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA) para cada hormona. La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/ml y la de 17β -estradiol en pg/ml.

Análisis Estadístico de Resultados

Los datos de concentración de serotonina, del 5-HIAA, progesterona, testosterona y estradiol se analizaron por la prueba de análisis de Varianza múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de TuKey. Cuando se compararon los resultados de dos grupos experimentales se utilizó la prueba "t" de Student, mientras que para los datos de población folicular se utilizó la prueba de X^2 . En todos los casos se consideraron como diferencias significativas aquellas en las que la probabilidad fue menor o igual a 0.05 ($p \leq 0.05$).



Resultados

Efecto de la administración de Vehículo (VH)

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en el hipotálamo anterior y medio de los animales que se inyectaron con vehículo y sacrificados a las 120 h después del tratamiento se incrementó significativamente la concentración de serotonina (Cuadro 1). En la hipófisis de los animales sacrificados a las 48 h después de la administración del vehículo, se observó un comportamiento inverso (Cuadro 2). En el ovario no se observaron cambios significativos (Cuadro 3).

La concentración de progesterona aumentó significativamente en el suero de los animales que se inyectaron con vehículo y sacrificados a las 48 h, mientras que a las 72 y 120 h disminuyó y la de testosterona y estradiol no se modificó en comparación con el grupo testigo absoluto (Cuadro 4).

Debido a que en los animales tratados con vehículo se observaron cambios en algunos de los parámetros evaluados, los efectos de la administración de p-Cloroanfetamina se analizaron al compararlos con sus respectivos grupos con vehículo.



Cuadro 1: Concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) y relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo de ratas hembras sin tratamiento (TA) o tratadas con solución salina (VH) y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento

Hipotálamo Anterior					
Grupo	n	5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-HT	
48hr	TA	10	1.14±0.15	0.64±0.03	0.46±0.03
	VH	10	1.35±0.08	0.71±0.05	0.54±0.05
72hr	TA	10	1.47±0.13	0.66±0.05	0.50±0.08
	VH	10	1.41±0.10	0.67±0.04	0.50±0.05
96hr	TA	10	1.32±0.07	0.61±0.04	0.46±0.02
	VH	9	1.35±0.19	0.72±0.10	0.54±0.07
120hr	TA	10	1.18±0.04	0.61±0.05	0.52±0.05
	VH	11	1.61±0.09 a	0.64±0.03	0.40±0.01
Hipotálamo Medio					
Grupo	n	5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-HT	
48hr	TA	10	1.41±0.17	0.63±0.10	0.49±0.08
	VH	10	1.09±0.06	0.65±0.07	0.59±0.07
72hr	TA	10	1.63±0.14	0.66±0.05	0.46±0.07
	VH	10	1.30±0.15	0.63±0.08	0.52±0.07
96hr	TA	10	1.16±0.08	0.70±0.09	0.62±0.10
	VH	8	1.54±0.41	0.89±0.27	0.59±0.10
120hr	TA	10	1.00±0.09	0.63±0.06	0.67±0.09
	VH	12	1.31±0.02 a	0.57±0.02	0.45±0.03

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



Cuadro 2: Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis de ratas hembras sin tratamiento (TA) o tratadas con solución salina (VH) y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

		Hipófisis		
Grupo		n	5-HT	5-HIAA
48hr	TA	8	0.18±0.02	0.03±0.01
	VH	10	0.08±0.01 a	0.07±0.05
72hr	TA	10	0.10±0.01	0.03±0.00
	VH	10	0.09±0.01	0.07±0.02
96hr	TA	10	0.08±0.01	0.26±0.17
	VH	10	0.11±0.01	0.06±0.01
120hr	TA	8	0.12±0.02	0.04±0.01
	VH	10	0.12±0.02	0.05±0.01

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

Cuadro 3: Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario de ratas hembras sin tratamiento (TA) o tratadas con solución salina (VH) y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

		Ovario		
Grupo		n	5-HT	5-HIAA
48hr	TA	10	0.34±0.08	0.17±0.02
	VH	8	0.27±0.03	0.25±0.12
72hr	TA	10	0.34±0.08	0.17±0.02
	VH	10	0.21±0.03	0.25±0.12
96hr	TA	10	0.34±0.03	0.14±0.01
	VH	9	0.41±0.05	0.07±0.01
120hr	TA	9	0.46±0.05	0.12±0.01
	VH	10	0.46±0.04	0.21±0.04

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



Cuadro 4: Concentración de progesterona, testosterona y estradiol en las ratas hembras sin tratamiento (TA) o tratadas con solución salina (VH) y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

Hormonas Esteroides				
Grupo		Progesterona	Testosterona	Estradiol
48hr	TA	5.36±0.74	27.51±6.52	21.12±1.50
	VH	9.40±1.40 a	51.98±21.7	19.42±1.22
72hr	TA	6.82±0.75	22.28±6.78	20.56±2.04
	VH	3.17±0.88 a	39.52±10.56	16.66±1.66
96hr	TA	5.20±1.20	52.07±13.24	24.77±1.54
	VH	4.23±0.77	23.92±5.19	21.88±0.99
120hr	TA	6.81±1.36	27.09±6.73	23.12±2.33
	VH	3.27±0.48 a	23.03±4.37	22.01±2.01

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



Efecto de la administración de p-Cloroanfetamina

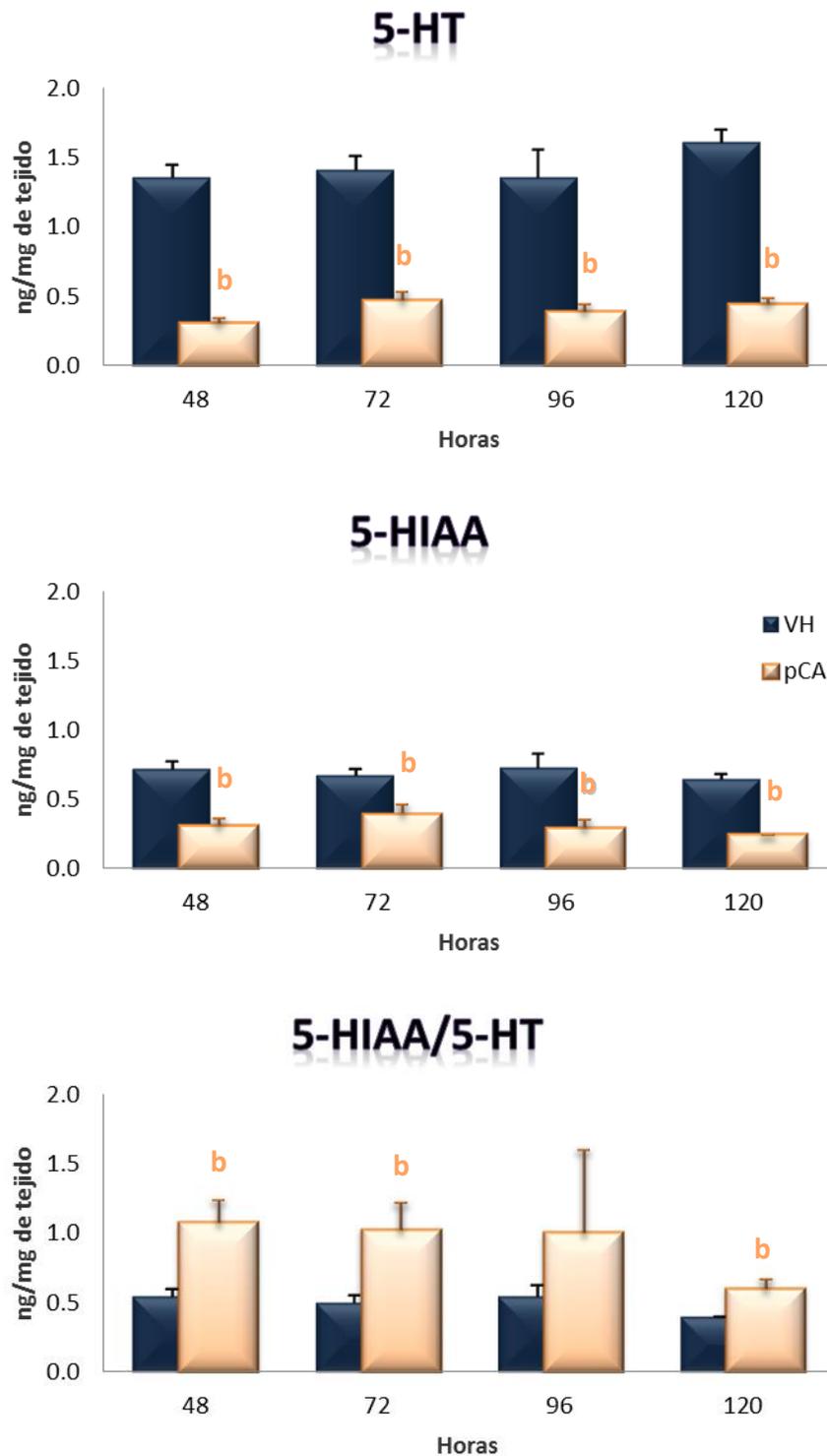
Sistema serotoninérgico en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario

En el hipotálamo anterior y medio de los animales tratados con p-Cloroanfetamina, la concentración de serotonina disminuyó significativamente en todos los periodos evaluados en comparación con los animales que se inyectaron con VH, este mismo comportamiento se observó en la concentración del 5-HIAA, con excepción del hipotálamo medio de los animales sacrificados a las 96 horas, debido a que la disminución del metabolito no llegó a ser significativa (figuras 6 y 7).

En comparación con el grupo de animales tratados con VH, en el hipotálamo anterior de los animales inyectados con p-Cloroanfetamina, se incrementó significativamente la relación 5-HIAA/5-HT a las 48, 72 y 120 horas posteriores a la administración del fármaco, mientras que en el hipotálamo medio se observó la tendencia al incremento en este parámetro, pero fue significativa únicamente en los animales sacrificados a las 72 horas postratamiento (figuras 6 y 7).

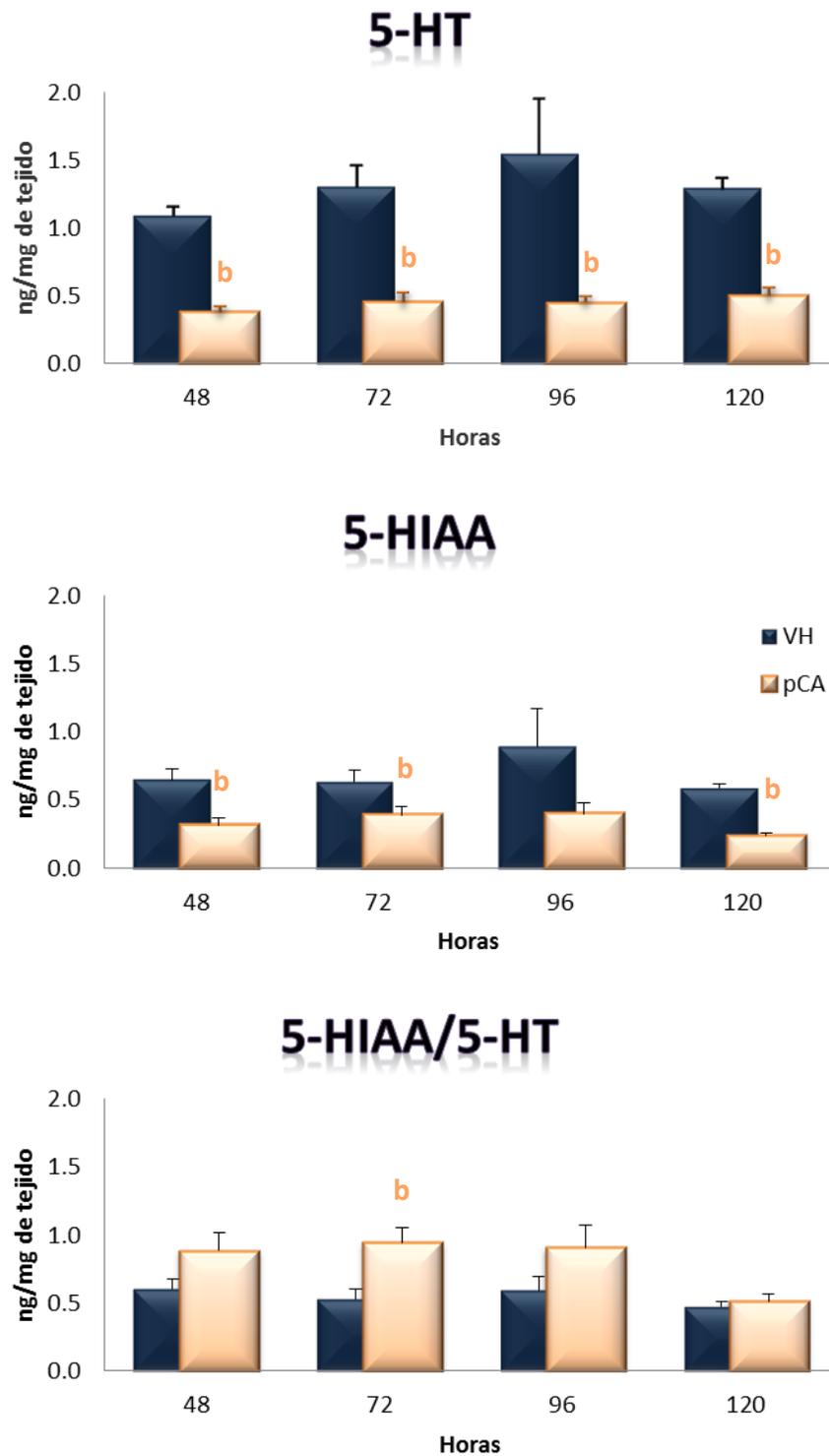
En la hipófisis de los animales a los que se les administró p-Cloroanfetamina, no se observaron cambios significativos en comparación con sus respectivos grupos VH (Figura 8).

La concentración de serotonina en el ovario no se modificó en los animales inyectados con pCA, mientras que la concentración del 5-HIAA disminuyó significativamente en los animales sacrificados a las 120 horas postratamiento (Figura 9).



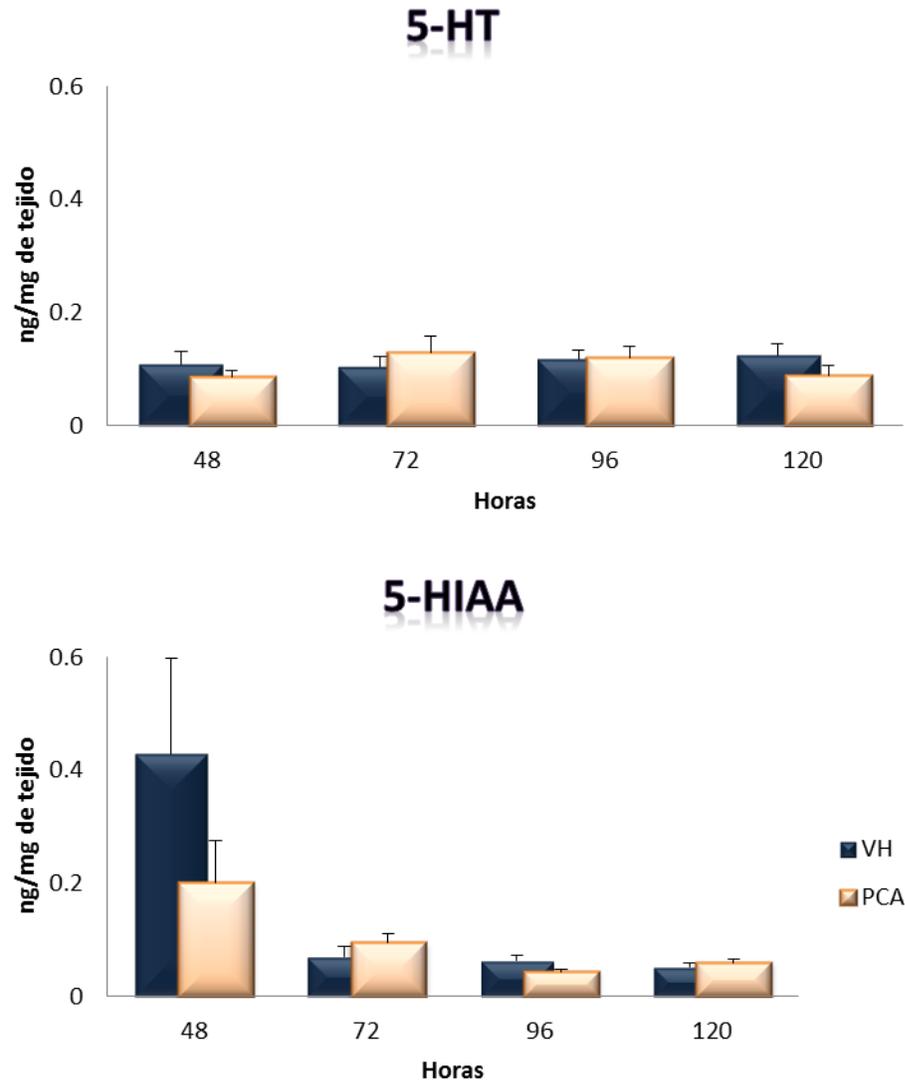
b, $p < 0.05$ vs. Grupo con VH (Prueba "t" de Student)

Figura 6: Concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) y relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo anterior de ratas hembras tratadas con solución salina (VH) o con 10mg/Kg pc de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.



b, $p < 0.05$ vs. Grupo con VH (Prueba "t" de Student)

Figura 7: Concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) y relación 5-HIAA/5-HT en el hipotálamo medio de ratas hembras tratadas con solución salina (VH) o con 10mg/Kg pc de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.



b, $p < 0.05$ vs. Grupo con VH (Prueba "t" de Student)

Figura 8: Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) en la hipófisis de ratas hembras tratadas con solución salina (VH) o con 10mg/Kg pc de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

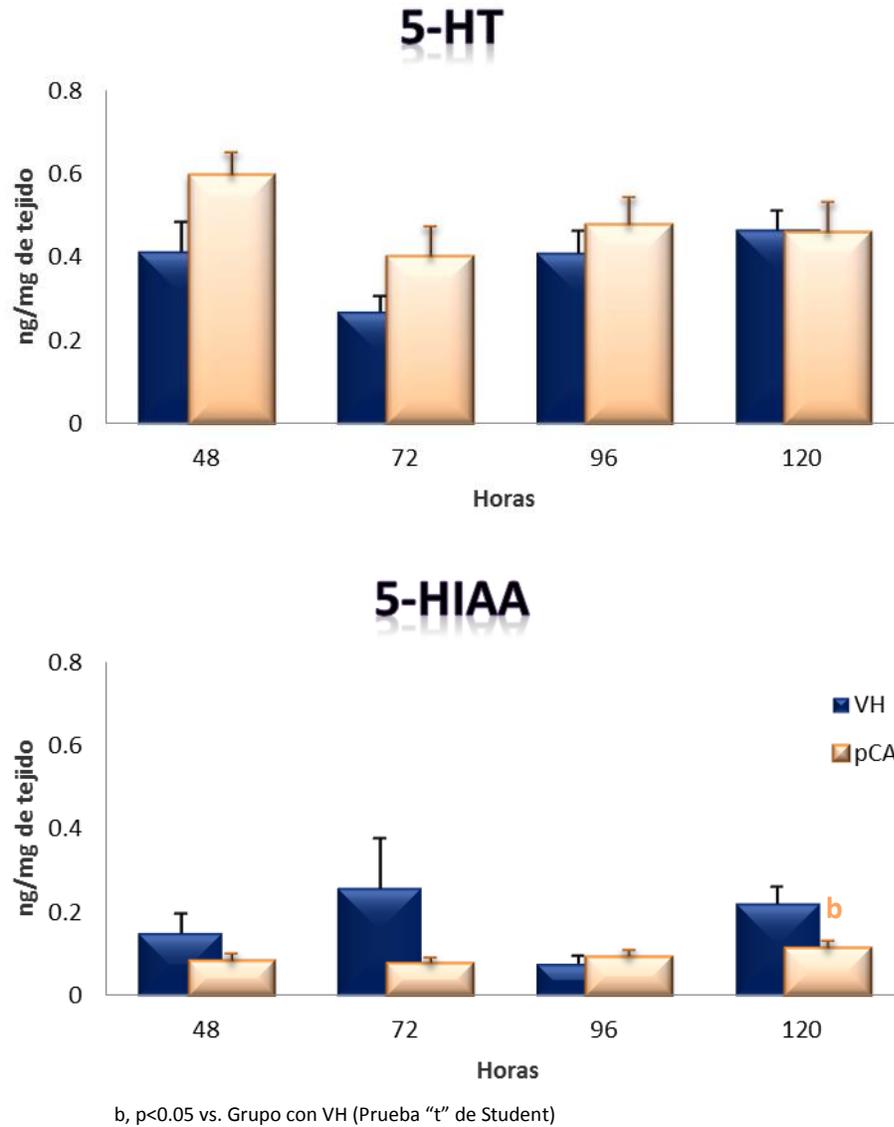


Figura 9: Concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-Hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario de ratas hembras tratadas con solución salina (VH) o con 10mg/Kg pc de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

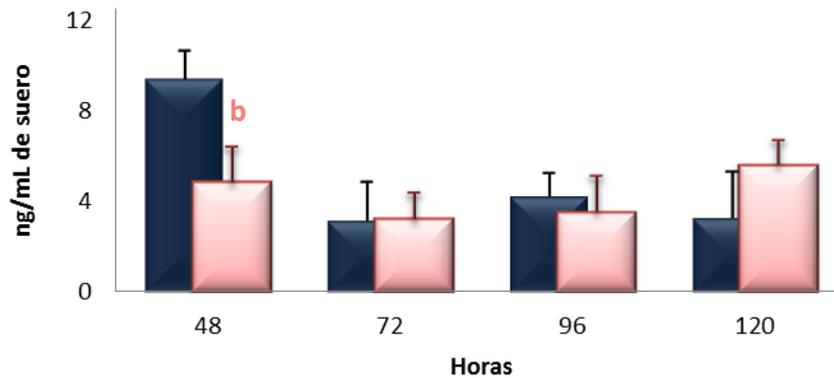


Concentración de hormonas esteroideas

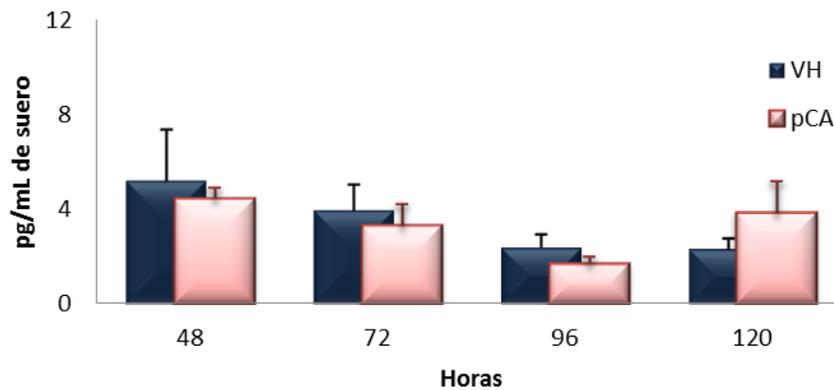
La concentración de progesterona en el suero de ratas tratadas con p-Cloroanfetamina disminuyó a las 48 h después de la inyección del fármaco en comparación con el grupo vehículo (Figura 10). No se observaron cambios en la concentración de testosterona. La concentración de estradiol en el suero de las ratas tratadas con p-Cloroanfetamina disminuyó significativamente en todos periodos estudiados en comparación con sus respectivos grupos con VH (Figura 10).



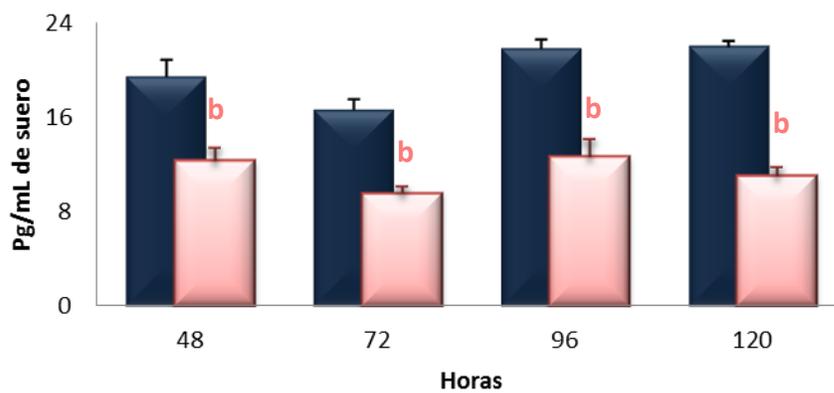
Progesterona



Testosterona



Estradiol



b, $p < 0.05$ vs. Grupo con VH (Prueba "t" de Student)

Figura10: Concentración de testosterona, progesterona y estradiol en las ratas hembras tratadas con solución salina (VH) o con 10mg/Kg pc de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

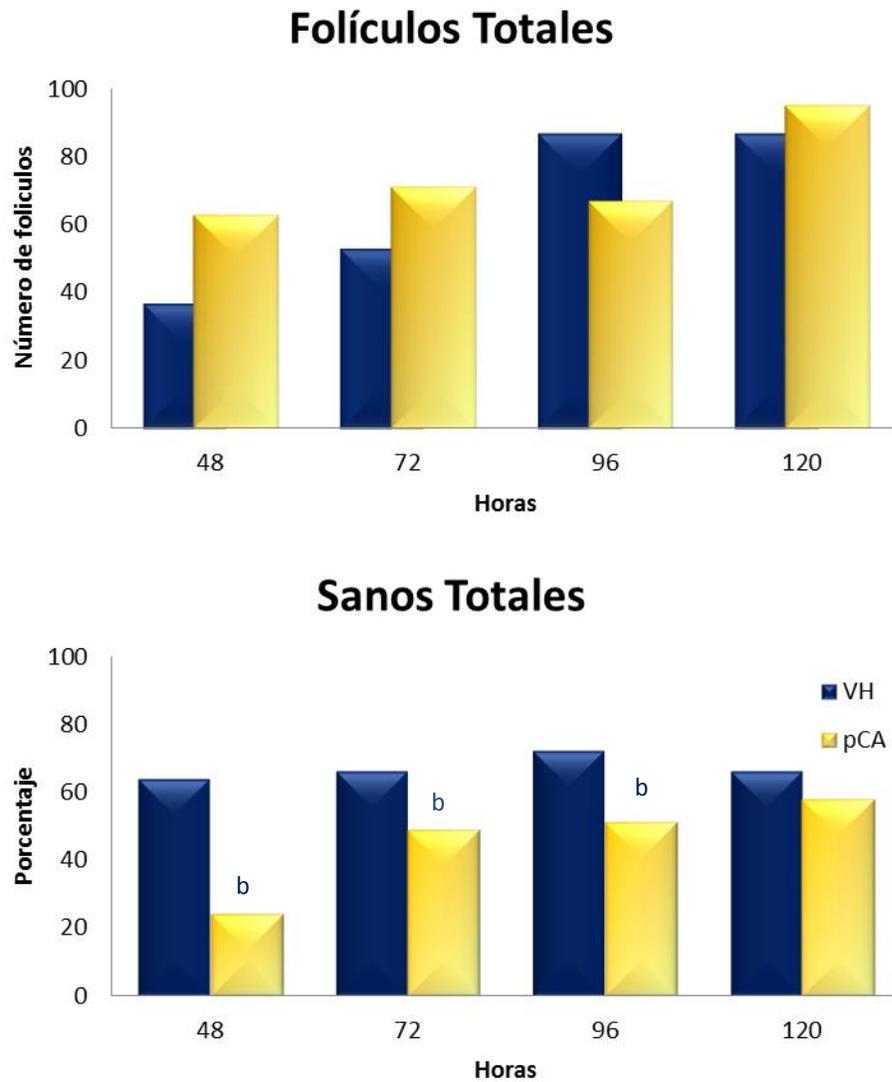


Población folicular

El porcentaje de folículos totales en el ovario no se modificó significativamente (Figura 11). Al analizar el estado de los folículos (sano o atresico) se observó que el porcentaje de folículos sanos fue menor a las 48, 72 y 96 horas postratamiento (Figura 11).

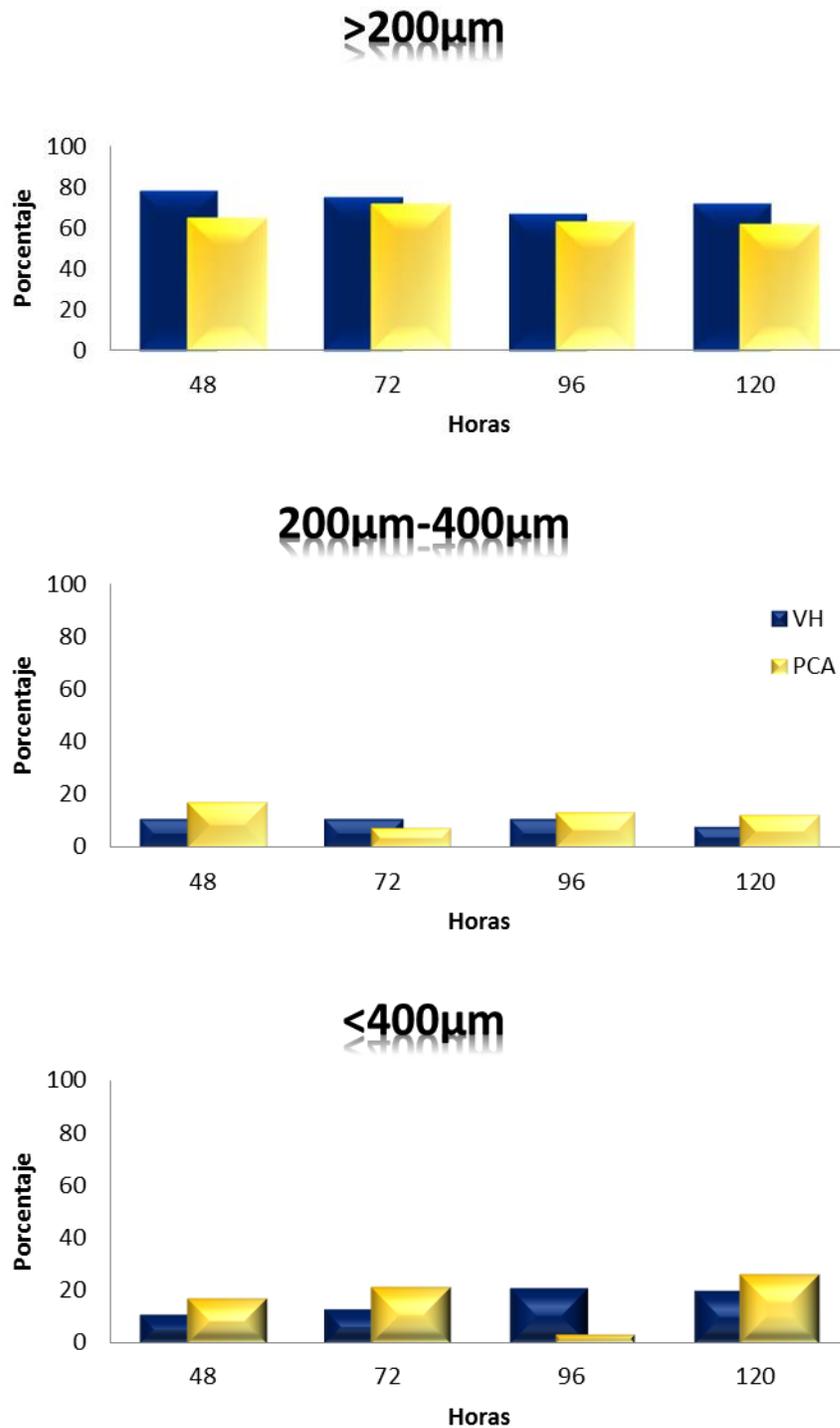
Los resultados del análisis de la población de folículos clase 1 (<200 μm), clase 2 (200-400 μm) y clase 3 (>400 μm) se presenta en la figura 12, en la que se muestra que en comparación con los animales a los que se les administró VH, los animales que recibieron la inyección de p-Cloroanfetamina no se modificó el porcentaje de folículos en las diferentes clases evaluadas.

En el análisis del estado de los folículos por clases, se observó, en los folículos de clase 1 una disminución a las 48, 72 y 96 horas después del tratamiento con p-Cloroanfetamina; en la clase 2 hubo un aumento a las 72 horas y una disminución a las 48 horas postratamiento; y, en la clase 3 se observó disminución a las 48 y 96 horas después de la inyección (Figura 13).



b, $p < 0.05$ vs. Grupo con VH (prueba " χ^2 ")

Figura 11: Porcentaje de folículos totales y sanos en los ovarios de ratas hembras tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/Kg de p-cloroanfetamina (PCA) y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120h después del tratamiento.



b, $p < 0.05$ vs. Grupo con VH (prueba " χ^2 ")

Figura 12: Porcentaje de foliculos pequeños (>200 μ m), medios (200-400 μ m) y preovulatorios (<400 μ m) en los ovarios de ratas hembras tratadas con soluci3n salina (VH) o con 10 mg/Kg de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 y 120h despu3s del tratamiento.

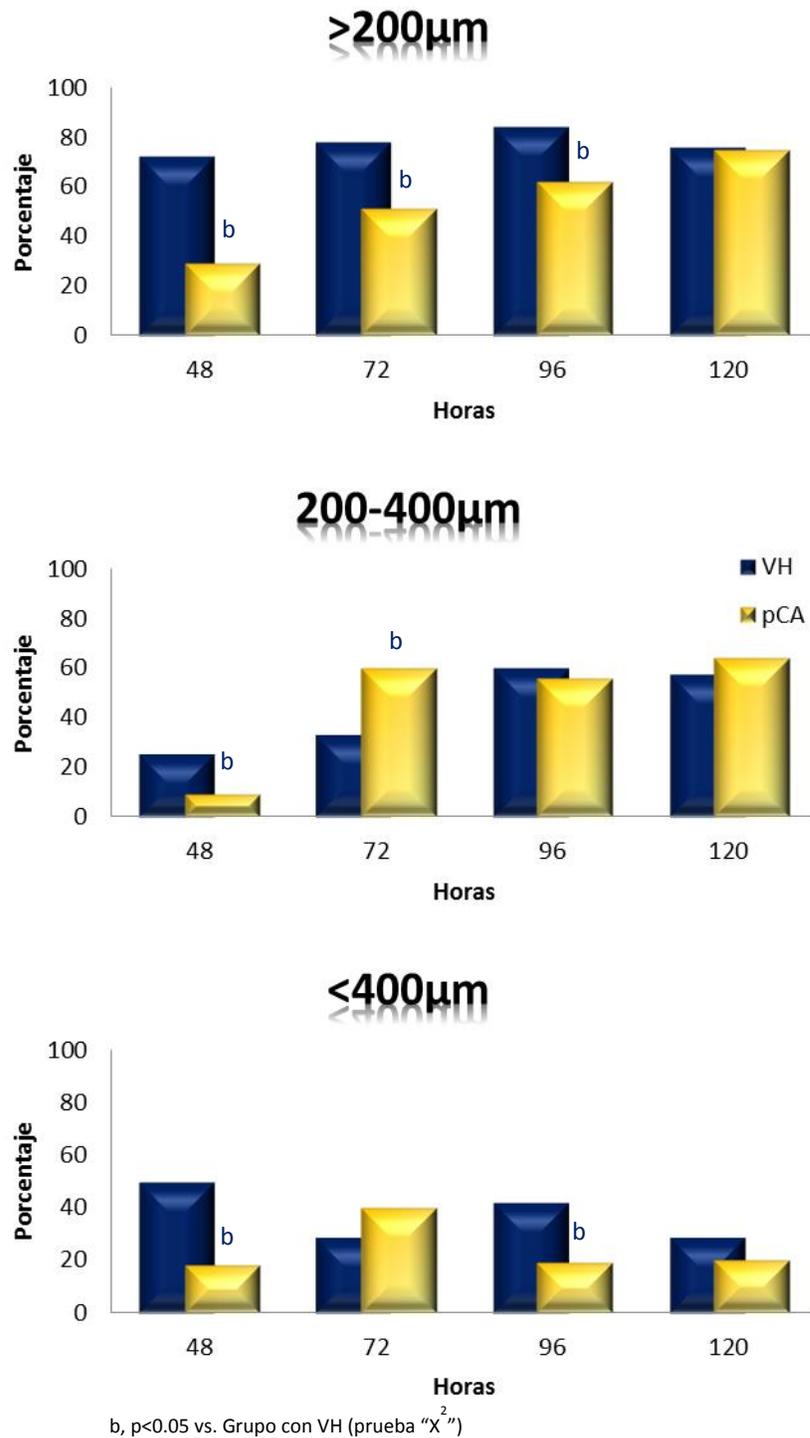


Figura 13: Porcentaje de folículos sanos pequeños (>200 μ m), medios (200-400 μ m) y preovulatorios (<400 μ m) en los ovarios de ratas hembras tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/Kg de PCA y sacrificados.



Atresia Folicular

Se analizó el porcentaje de folículos atresicos totales en el ovario de los animales tratados con p-Cloroanfetamina en comparación con el grupo vehículo y sacrificados a las 48, 72, 96 y 120 horas. Los criterios que se utilizaron son: engrosamiento de la teca, picnosis, alteración del folículo (entran en esta categoría aquellos que tengan doble ovocito) descamación de las células de la granulosa y aquellos que presentaban más de una característica fueron nombrados según el número de éstas (dos y tres). En los folículos que presentaron engrosamiento de la teca se observó una disminución a las 48 horas en el grupo tratado con p-Cloroanfetamina. Los folículos que presentaron descamación de las células de la granulosa tuvieron un efecto similar con una disminución a las 72 horas; se observó un efecto inverso a las 48 horas en los folículos con dos características atresicas del grupo tratado con p-Cloroanfetamina en comparación con el grupo VH. En las otras características y horarios de sacrificio no se observaron cambios significativos (Figura 14).

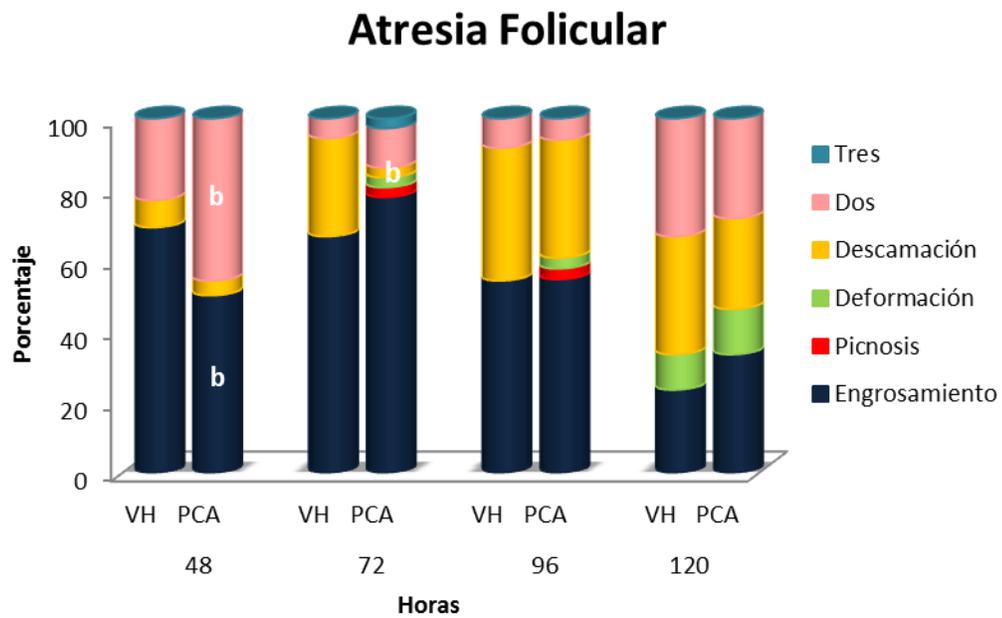


Figura 14: Porcentaje de los diferentes tipos de atresia (engrosamiento en teca, picnosis, deformación del folículo, descamación de las células de la granulosa o dos y tres de las características anteriores) en los folículos de los ovarios de ratas hembras tratadas con solución salina (VH) o con 10 mg/Kg de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 y 120h después del tratamiento.



Discusión

Los resultados del presente estudio nos permiten mostrar que la p-Cloroanfetamina disminuye la actividad del sistema serotoninérgico del hipotálamo y esto se acompaña de la modificación en las funciones del ovario, la esteroidogénesis y el crecimiento folicular. El hecho de que en los animales a los que se les administró la p-Cloroanfetamina se observara la disminución en la concentración de serotonina y de su metabolito, el 5-HIAA en el hipotálamo anterior y medio, así como la concentración de estradiol en el suero y el aumento de la atresia folicular, apoyan esta interpretación.

El vehículo utilizado para la administración de p-Cloroanfetamina fue solución salina, el cual se ha demostrado no tiene efectos colaterales al administrarlo, sin embargo, en el presente estudio se observó que en el hipotálamo de los animales que se les administró el vehículo y sacrificados a las 120 horas se incrementó la concentración de serotonina y de su metabolito, no se tiene una explicación a este hecho, sin embargo no se descarta la posibilidad de que estos cambios sean el resultado del efecto que genera el introducir una aguja de inyección a la cavidad abdominal, debido a que la inyección del vehículo fue vía intraperitoneal y por lo tanto durante este proceso se alteraron fibras que inervan esta región del cuerpo y que se comunican con la médula espinal y el cerebro (Altamirano & Montano, 1996; Schmidt, 1993), lo que se reflejó en cambios en el sistema serotoninérgico.

La disminución en la concentración de progesterona que se observó en los animales a los que se les administro vehículo y sacrificados a los diferentes periodos evaluados posiblemente también está vinculado a la activación de las fibras nerviosas que inervan la piel del abdomen. Con base en los estudios de Uchida y colaboradores (2005), quienes mostraron que los reflejos neurales de la piel que recubre la cavidad abdominal viajan a los ovarios y modifican el flujo sanguíneo (Stener, *et al.*, 2006) y la actividad del nervio ovárico superior (Uchida *et al.*, 2005). Los eventos antes mencionados posiblemente



provocaron modificaciones en la disponibilidad de las gonadotropinas que regulan la esteroidogénesis o alteraron la actividad del complejo enzimático que transforma el colesterol en progesterona, en relación a este último aspecto se ha mostrado que la inervación que transcurre por el nervio ovárico superior participa en la regulación de la esteroidogénesis por el ovario (Kagitani, *et al.*, 2008).

La p-Cloroanfetamina es liposoluble y tiene la capacidad de viajar por torrente sanguíneo y atravesar la barrera hematoencefálica (Robledo, 2008). Esto explica porque en nuestro modelo de estudio, la administración sistémica de una dosis de p-Cloroanfetamina modifica al sistema serotoninérgico del hipotálamo.

La disminución de hasta un 70% en la concentración de serotonina observada en el hipotálamo anterior y medio de los animales a los que se les inyectó la p-Cloroanfetamina, coincide con lo reportado previamente por otros autores y por trabajos generados en nuestro grupo de trabajo (Aragón, *et al.*, 2005; Sanders & Bush, 1974). Este evento es el resultado de que la anfetamina inhibió la actividad de la enzima limitante en la síntesis de serotonina, la triptófano hidroxilasa (TPH) (Sanders & Bush, 1972), aunado a esto se ha mostrado que la isoforma TPH₂ que se encuentra en el sistema nervioso central es más susceptible a los efectos de las anfetaminas (Zhang, *et al.*, 2006). En apoyo a esta idea, se ha mostrado que cuando se administra un derivado de las anfetaminas, el MDMA, disminuye la expresión del gen que codifica para la TPH₂, mientras que no se observan cambios en la TPH₁ (Cuyas, 2013).

También es posible que no se eliminara por completo la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y medio, posiblemente debido a que la amina cuantificada en el hipotálamo de los animales que se les administró la p-Cloroanfetamina, es la que proviene del núcleo medial, e inerva a los núcleos hipotalámicos (Calizo, *et al.*, 2011; Guyton, 1994; Monti, 2010). En relación a esto se ha mostrado que el sistema serotoninérgico que se origina en el MRN y DRN y que inervan el hipotálamo presenta una susceptibilidad diferente a la acción de los fármacos, el MRN es más resistente y las neuronas



serotoninérgicas que conforman al DRN son más vulnerable (Jacobs & Azmitia, 1992). La diferencia en la susceptibilidad de las neuronas serotoninérgicas que conforman estos dos núcleos del rafe se debe a la morfología de los axones y sus terminales, las neuronas del MRN tienen varicosidades más gruesas en comparación con las del DRN (Mamounas, *et al*, 1991). En estudios previos se ha demostrado que existen proyecciones serotoninérgicas que se dirigen al cerebro anterior y la mayoría de estas proyecciones proceden del núcleo dorsal (B7) y medial del rafe (B8), los cuales inervan al hipotálamo y la corteza cerebral principalmente (Fuxe, 1965; Olsten & Seiger, 1972).

En el hipotálamo anterior y medio de los animales a los que se les administró p-Cloroanfetamina, la disminución en la concentración de serotonina se acompañó de una menor concentración del metabolito, esto posiblemente es el resultado de que al disminuir la síntesis de serotonina, la disponibilidad de la amina que queda libre y es recapturada por la neurona presináptica es baja y esto se refleja en la menor concentración del 5-HIAA. Otra explicación a la menor concentración del metabolito, posiblemente se relacione con la disminución de la actividad de la SERT, la que transporta la serotonina a la neurona presináptica (Benarroch, 2013), o de la enzima monoamino oxidasa (MAO) que es la que metaboliza a la serotonina (Lesch, 2000). Esta idea se apoya en las evidencias que han mostrado que los derivados de las anfetaminas, como la p-Cloroanfetamina modifican la actividad de la MAO (Clark, *et al*, 1972).

El incremento de la relación metabolito/serotonina en el hipotálamo anterior y medio no es evidencia de que la actividad del sistema serotoninérgico se incrementó en los animales que se les administró la p-Cloroanfetamina. Este comportamiento en la relación metabolito/neurotransmisor nos indica que no existe un paralelismo en los efectos de la p-Cloroanfetamina sobre la síntesis y metabolismo de la amina, ya que se observó un efecto más marcado en la síntesis, lo que se reflejó en la disminución de la amina en un 62.8 % en comparación con su metabolismo (55.5 %).



En resultados previos del laboratorio se ha mostrado que en la hipófisis se lleva a cabo la síntesis de serotonina, debido a que cuando a ratas macho se les administra por vía sistémica el precursor de la síntesis de serotonina, el 5-hidroxitriptofano, la concentración de la amina aumenta en esta glándula a los 60 minutos posteriores al tratamiento (García et al., 2008). Sin embargo, en nuestro estudio se observó que en hipófisis de los animales tratados con p-Cloroanfetamina, la concentración de serotonina solo disminuyó a las 48 horas y a partir de las 72 horas se observó la recuperación del sistema serotoninérgico, posiblemente debido al aporte de serotonina por el DRN y MRN, este último es más resistente a los efectos de las anfetaminas (Papageorgiou & Deneff, 2007).

En cuanto a la concentración del ácido 5-hidroxiindolacético no se observaron cambios significativos en los periodos evaluados, esto posiblemente se asocia a que no se modificó la concentración de serotonina, que es el sustrato para la formación del 5-HIAA.

A diferencia de lo observado en el hipotálamo, en el ovario de los animales que se les administró la p-cloroanfetamina, la concentración de serotonina no se modificó, posiblemente debido a que en la gónada, particularmente en las células de la granulosa que rodean al ovocito se expresa la isoforma de la triptófano hidroxilasa TPH1 (Dubé y Amireaul, 2007), la cual es más resistente a los efectos de las anfetaminas (Zhang, *et al.*, 2006). Otra posibilidad es, que la serotonina cuantificada en el ovario de estos animales proviene de las plaquetas y mastocitos, debido a que estos tipos celulares son una fuente importante de la amina en la gónada (Ameisen, *et al.*, 1989; Sirotking & Schaeffer, 1997). En relación a la disminución en la concentración del 5-HIAA, observada en los animales tratados con la p-Cloroanfetamina y sacrificados a las 120 horas no se tiene una explicación.

La disminución en la concentración de estradiol observada en los animales a los que se les inyectó la anfetamina y sacrificados a los diferentes periodos nos indica que se modificó la esteroidogénesis en el ovario. El hecho de que se observara la disminución en la secreción de estradiol sin cambios en la producción de testosterona, nos permite pensar que se



modificó la actividad de la enzima P_{450} aromatasas en las células de la granulosa cuya función es transformar la testosterona en estradiol (Liu, *et al.*, 2013; Yen, *et al.*, 1999). Se ha demostrado que la actividad de la P_{450} aromatasas, presente en las células granulosa es indispensable para la conversión de los andrógenos tecales en estrógenos, principalmente en 17β -estradiol (Chedrese, 2003). Esta posibilidad se apoya en las evidencias de Lee y colaboradores (2013), quienes mostraron que cuando en la rata adulta se administra Bisfenol A disminuye la actividad de la enzima aromatasas y esto se acompaña de la menor concentración de estradiol.

Es posible que la disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y medio se acompañara de modificaciones en la síntesis y liberación de la GnRH y como consecuencia en la FSH (Prange, *et al.*, 2013), hormona que actúa en las células de la granulosa y estimula la producción de estrógenos (Webb, *et al.*, 2011). Por estudios de inmunohistoquímica se ha mostrado que en el hipotálamo anterior existe contacto entre los somas de las neuronas que secretan la GnRH y las terminales serotoninérgicas, mientras que en la eminencia media que forma parte del hipotálamo medio, existe contacto entre las terminales de ambas neuronas (Marvin, *et al.*, 2010).

La posibilidad de que la disminución en la concentración de serotonina modificará la secreción de la GnRH por el hipotálamo y de la FSH por la hipófisis, se apoya en las evidencias que han mostrado que la serotonina ejerce un efecto estimulador en la regulación de la secreción de la GnRH (Kim, *et al.*, 2006) y en la secreción de FSH, vía su unión a los receptores $5-HT_2$ en el área preóptica hipotalámica anterior (Gouveia & Celso, 2004) región que en el presente estudio se considera como parte del hipotálamo anterior.

En resultados previos del laboratorio se ha mostrado que cuando a ratas hembras prepúberes se les administra la p-Cloroanfetamina, la concentración de FSH en el suero disminuye a las 48, 72, 96 y 120 horas postratamiento (datos no publicados), estas evidencias apoyan la idea de que la disminución en la concentración de estradiol en el



suero de los animales tratados con la anfetamina se relaciona con la menor secreción de la FSH.

La disminución en la concentración de estradiol observada en los animales a los que se les administro la anfetamina, posiblemente se relacione con una menor secreción de FSH, debido a que esta gonadotropina al unirse a sus receptores de membrana en las células de la granulosa estimula una cascada de señalización que culmina con la activación de la enzima aromatasa, responsable de la aromatización de andrógenos a estrógenos (Yen, *et al.*, 1999).

Otra posible explicación a la disminución en la secreción de estradiol que se observó en los animales a los que se les administró la p-Cloroanfetamina, es que el fármaco modificó la esteroidogénesis en la glándula adrenal, que en el caso de la hembra es una de las fuentes de progesterona y de estradiol (Brandan, *et al.*, 2008).

Se ha reportado que la FSH y estrógenos son factores que favorecen el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. La FSH estimula el crecimiento folicular y la actividad de la aromatasa que convierte los andrógenos tecales en estradiol y este a su vez tiene la capacidad de amplificar todos los efectos de la FSH sobre la multiplicación celular e induce la expresión de los receptores a la FSH en las células de la granulosa (Knobil & Neill's, 2006; Webb, *et al.*, 2011). Con base en las evidencias antes mencionadas es posible que el incremento en la atresia que se observó en las diferentes clases de folículos, en el ovario de los animales que se les administró la p-Cloroanfetamina es posible que sea el resultado de la disminución en la concentración de estradiol que se observó en estos animales, en relación a esto se considera al estradiol un factor de supervivencia de las células de la granulosa (Rosales & Guzmán, 2008). En relación a esto se ha mostrado que cuando se mantienen en cultivo primordiales y al medio se le agrega una FSH + LH + estradiol se favorece el crecimiento y maduración de los folículos (Díaz, 1999; Jin & Li, 2013).



Conclusiones

La p-Cloroanfetamina disminuye la síntesis y metabolismo de la serotonina en el hipotálamo de la rata hembra prepúber.

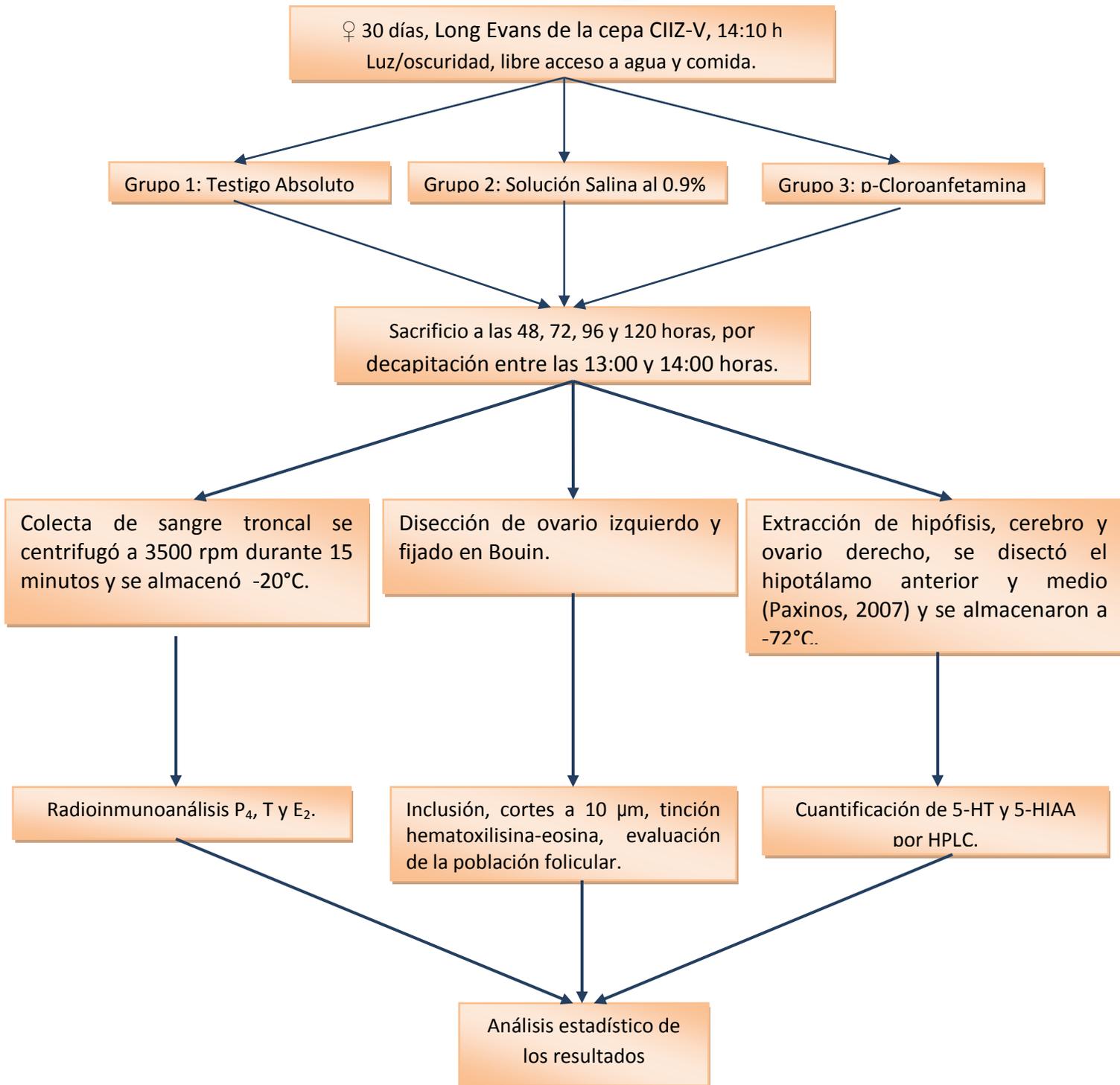
La p-Cloroanfetamina no modifica al sistema serotoninérgico de la hipófisis y del ovario de la rata hembra prepúber.

La disminución de la actividad del sistema serotoninérgico del hipotálamo se acompaña de la disminución en la secreción de estradiol.

La p-Cloroanfetamina modifica el crecimiento del folículo e induce la atresia en el ovario de la rata hembra prepúber.



Material y Método





Referencias Bibliográficas

- ◆ Battista P & Condon A. (1986) *Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow luteal cell in vitro*, Journal of Reproduction and Fertility Ltd, 76: 231- 238.
- ◆ Baumgarten H, Lachenmayer L. (2004) Serotonin neurotoxins - past and present, Neurotoxicity Research, 6: 589-614.
- ◆ Becú de Villalobos M, Lux V, Lacau de Mendigo M & Libertun C. (1984) *Sexual differences in the serotonergic control of prolactin and luteinizing hormone secretion in the rat*, Endocrinology, 115: 84- 89.
- ◆ Bloom W & Fawcett D. (2003) *Tratado de Histología*, McGraw-Interamericana, España, p 280-286.
- ◆ Bódis J, Török A, Hans-Rudolf T, Hanf V, Hamori M & Cledon P. (1992) *Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulose cells*. Fertility and Sterility, 57: 1008-1011.
- ◆ Brailowsky, Simón. (2002) *Las Sustancias de los Sueños: Neuropsicofarmacología*, ed. 3°, Fondo de Cultura Económica, México, p 184-216.
- ◆ Colado M, O'shea E, Granados R, Misra A, Murray T & Green A. (1997) *A study of the neurotoxic effect of MDMA ('ecstasy') on 5-HT neurones in the brains of mothers and neonates following administration of the drug during pregnancy*, British Journal of Pharmacology, 121: 827-833.
- ◆ Connolly, Seans. (2000) *Need to Know Amphetamines*, Heinemann Library, p 12-33.
- ◆ Cravioto C, Pérez G, Villalpando I & Larrea F. (1997) *Las funciones reproductoras de la mujer*, Fondo de cultura económica, México, p 257-262.
- ◆ De Ahumada I, Santana L & Serrano J. (2002) *Farmacología practica para las diplomaturas en ciencias de la salud*, Díaz de Santos, Madrid, p 105- 107.
- ◆ Dubé F & Amireault P. (2007) *Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos*, Life Sciences, 8: 1627–1637.
- ◆ Fawcett, Don. (2005) *Compendio de Histología*, McGraw-Interamericana, España, p 158-163 y 280-292



- ◆ Flores F, Rosas C, Romero M & Pérez M. (2005) Apoptosis and follicular atresia: An essential binomial for ovarian development, *Revista Veterinaria de México*, 36: 87-103
- ◆ Frankfurt M, Lauder J & Azmitia E. (1981) *The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus*, *Neuroscience Letters*, 24: 227-23.
- ◆ García M., Velásquez D, Monroy J, Ayala E, Domínguez R. *Efecto de la estimulación del sistema serotoninérgico en la concentración de gonadotropinas en suero y de serotonina en hipófisis y testículo en la rata macho prepúber*. C-251. LI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas, Mérida Yucatán, México. 7 al 11 de septiembre del 2008.
- ◆ Gouveia M & Celso R, (2004) *Involvement of serotonin 5HT1 and 5HT2 receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion*, *Brain Research Bulletin*, 63: 243–251.
- ◆ Herbison, A. (2006) *Physiology of the gonadotropin-releasing hormone neuronal network*. *Physiology of Reproduction*. 1: 1415-1482.
- ◆ Holzbauer M, Racké K & Sharman DF. (1985) *Release of endogenous 5-hidroxitriptamine from the neural and the intermediate lobe of the rat pituitary gland evoked by electrical stimulation on the pituitary stalk*, *Neuroscience*, 15: 723-728.
- ◆ Huff C, Bhide N, Schroering A, Yamamoto B & Gudelsky G. (2013) Effect of repeated exposure to MDMA on the function of the 5-HT transporter as assessed by synaptosomal 5-HT uptake, *Brain research Bulletin*. 10: 1010-1016.
- ◆ Jennes L, Beckman WC, Stumpf WE & Grzanna R. (1982) *Anatomical relationships of serotonergic and noradrenalinergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus*, *Experimental Brain Research*, 46: 331-338.
- ◆ Johns M, Azmitia E & Krieger D. (1982) *Specific in vitro uptake of serotonin by cells in the anterior pituitary of the rat*. *Endocrinology*, 110: 754-760.
- ◆ Kagitani F, Uchida S, Hotta H. (2008) *Effects of electrical stimulation of the superior ovarian nerve and the ovarian plexus nerve on the ovarian estradiol secretion in rats*, *Journal of Physiology Science*, 58: 133-138.



- ◆ Kankaanpaa A, Meririnne E, Lillsunde P & Seppala T. (1998) *The acute effects of amphetamine derivatives on extracellular serotonin and dopamine levels in rat nucleus accumbens*. Pharmacology, Biochemistry and Behavior, 59: 1003-9.
- ◆ Kanno K, Shima S, Ishida Y & Yamanouchi K. (2008) *Ipsilateral and contralateral serotonergic projections form dorsal and medial raphe nuclei to the forebrain in rats: immunofluorescence quantitative analysis*. Neuroscience Research. 61: 207-218.
- ◆ Kiss J & Halász B. (1984) *Serotonergic endings on VIP-neurons in the suprachiasmatic nucleus and on ACTH-neurons in the arcuate nucleus of the rat hypothalamus. A combination of high resolution autoradiography and electron microscopic immunocytochemistry*, Neuroscience Letters. 44:119-124.
- ◆ Knobil & Neill's. (2006) *Physiology of Reproduction*, 3° ed, Elsevier, USA, p 382-593.
- ◆ Liang N & Rutledge C. (1982) *Comparison of the release of (H3) dopamine from isolated striatum by amphetamine, fenfluramine and unlabelled dopamine*. Biochemical Pharmacology, 31: 983-992.
- ◆ Lorenzo P & Lizasoain I. (2003) *Características farmacológicas de las drogas recreativas (MDMA y otras anfetaminas, Ketamina, GHB, LSD y otros alucinógenos)*, Adicciones, 15: 51-75.
- ◆ Mamounas L, Mullen C, O'Hearn E & Molliver M. (1991) *Dual serotonergic projections to forebrain in the rat: morphologically distinct 5-HT axon terminals exhibit differential vulnerability to neurotoxic amphetamine derivatives*, The Journal of Comparative Neurology, 314:558-86.
- ◆ Matsuda F, Inque N, Manabe N & Ohkura S. (2012) *Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: Regulation by survival and death of granulosa cells*, Journal of Reproduction and Development, 58: 44-50.
- ◆ Mendoza, Nicandro. (2008) *Farmacología médica*, Panamericana, México, p 280-293
- ◆ Monroy J, Ayala ME, Chavira R, Damián-Matsumura P, Dominguez R. (2003) *Comparative effects of injecting 5,6-dihidroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty*. Brain Research Bulletin, 60: 307-315.



- ◆ Morán M, Ayala M, Gallegos E, Romero J, Chavira R, Damián-Matsumura P, Dominguez R. (2012) Effects of systemic administration or intrabursal injection of serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in rats. *Reproduction Fertility and Development*.
- ◆ Muñoz H & Vargas A. (2004) *Síndrome serotoninérgico* (Revisión); *Medicine UNAB.*, 7: 144-1450.
- ◆ Neil, Carlson. (2005) *Fisiología de la conducta*, Pearson, Madrid, p 29- 35 y 71- 80.
- ◆ Osborne N & Hamon M. (1988) *Neuronal Serotonin*, Ed. John Wiley & Sons Ltd., New York, p 25-53
- ◆ Pallardo, Luis. (2010) *Endocrinología clínica*, 2ªed, Ed. Díaz Santos, España, p 1-7.
- ◆ Papageorgiou A & Deneff C. (2007). *Estradiol induces expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₄, 5-HT₅, and 5-HT₆ receptor messenger ribonucleic acid in rat anterior pituitary cell aggregates and allows prolactin release via the 5-HT₄ receptor estradiol induces expression of 5-hydroxytryptamine (5-HT)₄, 5-HT₅, and 5-HT₆ receptor messenger ribonucleic acid in rat anterior pituitary cell aggregates and allows prolactin release via the 5-HT₄ receptor*. *Endocrinology*, 148: 1384-1395.
- ◆ Pinilla L, Gonzales L, Tena M & Aguilar E. (2003) *5-HT₁ and 5-HT₂ receptor activation reduces N-methyl-D-aspartate (NMDA)-stimulated LH secretion in prepubertal male and female rats*, *European Journal of Endocrinology*, 148: 121–127.
- ◆ Prange J, Schmutterer T, Fester L, Zhou L, Imholz P, Brandt N, Vierk R, Jarry H, Rune G. (2013) *Endocrine regulation of estrogen synthesis in the hippocampus?*, *Progress in Histochemistry and Citochemistry*, 48: 49-64.
- ◆ Prieto B & Velázquez M. (2002) *Fisiología de la Reproducción: Hormona liberadora de las gonadotrofinas (Monografía)*. *Revista de Medicina UNAM.*, 45: 252- 257
- ◆ Ramírez, Lílido. (2006) *El hipotálamo de los mamíferos domésticos*, *Rev. Mundo pecuario*, Nº 1, 16-17, *Universidad de los andes, Venezuela*.
- ◆ Rosales AM & Guzmán A. (2008) *Apoptosis in follicular atresia and luteal regression*, *Técnica Pecuaria en México*, 46: 159-182.



- ◆ *Saland, L. (2001). The mammalian pituitary intermediate lobe: an update on innervation and regulation. Brain Research Bulletin. 54: 585-593.*
- ◆ *Sanders-Bush E, Bushing J & Sulser F. (1974) Long-Term affects of p-Chloroamphetamine and Related Drugs on Central Serotonergic Mechanisms, The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 192: 33-41.*
- ◆ *Sanders-Bush E, Bushing J & Sulser F. (1972) Long-Term effects of p-chloroamphetamine on tryptophan hydroxylase activity and on the levels of 5-hydroxytryptamine and 5-hydroxyindole acetic acid in brain, European Journal of Pharmacology, 20: 385–388*
- ◆ *Schmidth G, P, Owman C & Sjöberg N. (1988) Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused in vitro? Acta Psicológica Escandinavica, 132: 251-256.*
- ◆ *Sekerke J, Smith H, Bushing J, Sanders-Bush E. (1975) Correlation Between Brain Levels and Biochemical Effects of the Optical Isomers of p-Chloroamphetamine; The journal of pharmacology and experimental therapeutics, 193:835- 843.*
- ◆ *Shoblock J, Sullivan E, Maisonneuve I & Glick S. (2003) Neurochemical and behavioral differences between d-methamphetamine and d-amphetamine in rats. Psychopharmacology, 165: 359-69.*
- ◆ *Silbernagl, S. (2009) Fisiología: texto y atlas, 7°ed, Panamericana, México, p 268-307.*
- ◆ *Sirotkin A & Schaeffer H. (1997) Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin. Journal of Endocrinology, 152: 1-5.*
- ◆ *Souccar, Thierry. (2004) Le guide des nouveaux stimulants, 2°ed, Paidotribo, Barcelona, p 29-30*
- ◆ *Speroff, Leon. (1999) Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility. 6ª ed. Mc Graw, USA, p 264 289.*
- ◆ *Sprague J, Johnson M, Schmidt J, Nichols E. (1996) Studies on the Mechanism of p-Chloroamphetamine Neurotoxicity, Biochemical Pharmacology, 52:1271- 1277.*



- ◆ Stener E, Fujisawa S, Kurosawa M. (2006) *Ovarian blood flow responses to electroacupuncture stimulation depend on estrous cycle and on site and frequency of stimulation in anaesthetized rats*, Journal of applied physiology, 101: 84-91.
- ◆ Uchida S, Kagitani F, Hotta H, Hanada T, Aikawa Y. (2005) *Cutaneous mechanical stimulation regulates ovarian blood flow via activation of spinal and supraespal reflex pathways in anesthetized rats*, The Japanese journal of physiology, 55: 265-277.
- ◆ Utrilla, P. (2000) *Aspectos farmacológicos de las anfetaminas*, Departamento de farmacología, España, Ars Pharmaceutica, 41: 67- 77.
- ◆ Vega, Margarita. (1997) *Bases Biológicas de la Función Ovárica*, Serie Científica Básica, Centro de Extensión Biomédica Universidad de Chile.
- ◆ Wada K, Lian H, Mores N, Navarro C, Hirotooshi F, Krsmanovic L & Catt K. (2006) *Serotonin (5-HT) Receptor Subtypes Mediate Specific Modes of 5-HT-Induced Signaling and Regulation of Neurosecretion in Gonadotropin-Releasing Hormone Neurons*, Molecular Endocrinology, 20: 125–135.
- ◆ Wright D & Jennes L (1993) *Lack of expression of serotonin receptor subtype -1 α , 1c, and -2 mRNAs in gonadotropin-releasing hormone producing neurons of the rat*, Neuroscience Letters, 163: 1–4.
- ◆ Yen, Jeffe & Barbieri. (1999) *Endocrinología de la reproducción; Fisiología, Fisiopatología y Manejo clínico*, 4ed, Panamericana, México, p108-110.
- ◆ Zubaran C & Lazzaretti R. (2013) *The use of appetite suppressants among health sciences undergraduate students in Southern Brazil*, Einstein (Sao Paulo), 11:47-52.