



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**EFEECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE P-CLOROANFETAMINA EN
LA BURSA DEL OVARIO EN LA CONCENTRACIÓN DE HORMONAS
ESTEROIDES Y ESTRUCTURA DEL OVARIO EN LA RATA HEMBRA
PREPÚBER**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA:

OLIVIA CRUZ HERNÁNDEZ

DIRECTORA DE TESIS: Dra. María Elena Ayala Escobar



MÉXICO D.F

2014

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE P-CLOROANFETAMINA EN LA BURSA DEL OVARIO EN LA
CONCENTRACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES Y ESTRUCTURA DEL OVARIO EN LA RATA
HEMBRA PREPÚBER

Tesis que para obtener el título de bióloga presenta: Olivia Cruz Hernández

Directora de Tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar

Realizada en el Laboratorio de Pubertad de la Unidad de Investigación en Biología de la
Reproducción, UMIEZ. FES Zaragoza. UNAM.

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

Agradecimientos

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por el apoyo brindado para la realización de este trabajo, por compartir sus conocimientos conmigo, por su paciencia y comprensión durante mi desarrollo académico.

A los miembros del jurado:

M. C. Raúl Zavala Chavero
Dra. María Elena Ayala Escobar
Dra. María Esther Cruz Beltrán
Biól. Carlos Martínez Montoya
Dra. Leticia Morales Ledesma

Por el tiempo invertido en la revisión de esta tesis y por aportar sus conocimientos y experiencia al evaluarlo.

A Marisol, por haberme apoyado en la realización experimental de este trabajo y por la amistad brindada en todo este tiempo.

A la Dra. Adriana Altamirano Bautista y Dr. Román Hernández Meza, responsables del bioterio de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, por su valiosa colaboración al haber proporcionado y cuidado a los animales utilizados en este estudio.

A mis padres

Por apoyarme incondicionalmente durante el largo camino recorrido hasta este momento, porque aún sin merecerlo, nunca dejaron de creer en mí. Son mi motivo de orgullo y de mi más grande admiración.

Este logro es de ustedes, los amo.

A mis hermanos

Porque me motivan a dar lo mejor de mí, espero valoren mis logros, pero sobre todo aprendan de mis errores, los quiero con todo el corazón.

Y a ti Ivan, porque sin que lo buscaras, me diste una razón más para finalizar esta etapa e iniciar con éxito una nueva contigo.

Índice

Resumen.....	i
Introducción	1
Marco teórico	3
p-Cloroanfetamina	4
Serotonina	5
Ovario.....	9
Foliculogénesis	10
Atresia folicular	13
Esteroidogénesis.....	14
Regulación hormonal de las funciones del ovario	19
Serotonina y Ovario	19
Inervación ovárica y esteroidogénesis.....	21
Justificación	23
Hipótesis.....	24
Objetivo general	25
Objetivos particulares.....	25
Material y Método.....	26
Animales.....	26
Grupos experimentales.....	26
Administración de PCA o de vehículo en bursa del ovario	26
Procedimiento de sacrificio de animales	27
Cuantificación de serotonina, noradrenalina, dopamina y sus metabolitos.....	27
Cuantificación de hormonas esteroides	27
Estudio histológico	28
Fijado e inclusión del ovario.....	28
Cortes, montaje y tinción	28
Análisis de la estructura y población folicular	31
Análisis estadístico	31

Resultados	32
Efecto de la administración de solución salina 0.9% (VH) en bursa del ovario	32
Concentración de serotonina y su metabolito	32
Concentración de noradrenalina y su metabolito	33
Concentración de dopamina y su metabolito	34
Concentración de hormonas esteroides	35
Población folicular	36
Efecto de la administración de PCA en la bursa del ovario	37
Concentración de serotonina y su metabolito	37
Concentración de noradrenalina y su metabolito	38
Concentración de dopamina y su metabolito	39
Concentración de hormonas esteroides	40
Población folicular	42
Atresia folicular	46
Discusión	49
Conclusiones	55
Bibliografía	56

RESUMEN

La serotonina se ha identificado en el sistema nervioso central y en el ovario. En este se encuentran algunos marcadores del sistema serotoninérgico, como son: la triptófano hidroxilasa (TPH), la monoamino oxidasa (MAO), la proteína transportadora de la serotonina para su recaptura (SERT) y el receptor a serotonina 5-HT_{1D}. Aunado a esto, se sugiere que la serotonina actúa de forma local en el ovario modulando sus funciones, esteroidogénesis y ovulación. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de un inhibidor del sistema serotoninérgico, la p-Cloroanfetamina (PCA), directamente en la bursa del ovario sobre la concentración de serotonina, noradrenalina y dopamina en la gónada, de hormonas esteroides en suero y en el crecimiento folicular en la rata prepúber.

Ratas hembra de 30 días de edad fueron divididas al azar en 3 grupos: a un grupo se le administró una dosis de 0.1mg/ovario de PCA, a otro grupo se le administró 40 µL de solución salina (VH) y como grupo de comparación se utilizaron animales sin ningún tratamiento. Los animales se sacrificaron a las 48, 72, 96 y 120 horas posteriores al tratamiento.

En comparación con el grupo VH, a los animales que se les administró PCA y se sacrificaron a las 48 h, la concentración de serotonina disminuyó significativamente (0.93 ± 0.04 vs. 0.32 ± 0.02 ng/mg de tejido, $p < 0.05$), mientras que la concentración del metabolito se incrementó a las 48 h (0.08 ± 0.01 vs. 0.16 ± 0.03 ng/mg de tejido, $p < 0.05$) y a las 96 h (0.12 ± 0.02 vs. 0.075 ± 0.01 ng/mg de tejido, $p < 0.05$). La concentración de noradrenalina no se modificó mientras que la concentración del ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) se incremento en todos los periodos estudiados, excepto a las 72 h. La concentración de dopamina en los animales tratados con PCA aumentó significativamente a las 48 h (0.04 ± 0.01 vs. 0.41 ± 0.11 ng/mg de tejido, $p < 0.05$), disminuyó a las 72 h (0.70 ± 0.17 vs. 0.22 ± 0.07 ng/mg de tejido, $p < 0.05$), mientras que a las 96 y 120 h la concentración de la amina estuvo por debajo de la sensibilidad del método. La concentración del ácido 3,4-

dihidroxifenil acético (DOPAC) estuvo por debajo de la sensibilidad del método a las 48, 92 y 120 h mientras que a las 72 h no se presentaron cambios.

En comparación con sus respectivos grupos VH, la concentración de progesterona en los animales tratados con PCA aumentó significativamente a las 48 h (1.88 ± 0.32 vs. 5.34 ± 1.35 ng/mL de suero, $p < 0.05$) y en los otros periodos no se presentaron cambios significativos. La de testosterona no se modificó y el estradiol disminuyó significativamente en todos los periodos evaluados (48 h: 5.99 ± 0.38 vs. 3.60 ± 0.57 pg/mL de suero; 72 h: 7.23 ± 1.40 vs. 3.42 ± 0.67 pg/mL de suero; 96 h: 9.2 ± 2.07 vs. 2.19 ± 0.78 pg/mL de suero; y 120 h: 10.24 ± 2.58 vs 2.36 ± 0.28 pg/mL de suero, en todos la $p < 0.05$).

En comparación con los animales que se les administró el VH, en todos los animales tratados con PCA no se modificó el porcentaje de folículos totales, ni por clase, con excepción de los folículos clase-1 que disminuyeron significativamente en los animales sacrificados a las 96 h y en los folículos clase-2 se observó un comportamiento inverso.

El porcentaje de folículos atrésicos totales y por clase se incremento significativamente en todos los animales que se les administró la PCA, en comparación con el grupo tratado con VH.

Con base en estos resultados es posible sugerir que la serotonina participa en la modulación de la secreción de estradiol por el ovario y que su participación varía con la edad del animal.

INTRODUCCIÓN

Las anfetaminas son drogas sintéticas que son estimulantes del Sistema Nervioso Central (SNC), se utilizan como drogas recreacionales o fármacos, con la finalidad de atender problemas de depresión, para suprimir el apetito, y en niños y jóvenes con problemas de déficit de atención (Robledo, 2008). La mayoría de las anfetaminas son derivados metoxilados que modifican la actividad de los sistemas de neurotransmisión como la serotonina (Utrilla, 2000).

La serotonina es una amina biogénica que funciona como neurotransmisor y que participa en la regulación de funciones como la alimentación, el sueño y en la modulación de las funciones de glándulas endocrinas como el ovario y testículo (Muñoz y Vargas, 2004), cuyas funciones son la producción de gametos y la secreción de hormonas esteroides y proteicas. En el caso del ovario, la producción de óvulos y la producción de estrógenos y progesterona principalmente (Yao y Bahr, 1999).

Las funciones del ovario son reguladas por las gonadotropinas, hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH). La FSH, favorece la multiplicación de las células de la granulosa, crecimiento del folículo y la aromatización de los andrógenos a estrógenos. La LH estimula el desarrollo final de los folículos, la ovulación y la síntesis de los andrógenos; sustrato para la formación de los estrógenos (Boron y Boulpaep, 2012; Botella, 1995). Además de las gonadotropinas, la inervación que recibe el órgano y productos del propio ovario como los estrógenos y factores de crecimiento entre otros, participan en la modulación de sus funciones (Yao y Bahr, 1999, Tresguerres, 2010).

La serotonina participa en la regulación de la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) por el hipotálamo y de gonadotropinas por la hipófisis, y como consecuencia en las funciones del ovario (Gouveia y Rodrigues, 2004). Aunado a esto, también existen reportes que indican la presencia de algunos componentes del sistema

serotoninérgico en el ovario. En las células del cumulus ooforus se encuentra la enzima limitante de la síntesis de serotonina, la TPH₁, cuatro subtipos de receptores a serotonina y la proteína transportadora de la serotonina para su recaptura (SERT) (Dubé y Amireault, 2007). Conjuntamente estas evidencias permiten pensar que la serotonina sintetizada localmente en el ovario ejerce una función en este órgano. Por ello, en el presente estudio se analizó el efecto de administración en la bursa del ovario de un inhibidor del sistema serotoninérgico, la p-cloroanfetamina; sobre el sistema serotoninérgico, noradrenérgico y dopaminérgico del ovario, así como la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en el suero y el desarrollo folicular.

MARCO TEÓRICO

El uso no médico de fármacos es un problema social grave al que no se le da la importancia debida. El abuso se asocia con la búsqueda del placer, el alivio del estrés, una forma de evadir una realidad agobiante, entre otras causas (Brailowsky, 2002).

Las anfetaminas fueron sintetizadas por primera vez en 1887, posteriormente en 1920 se descubrió que el compuesto original, el sulfato de anfetamina y su dextroisómero que es aún más activo, el sulfato dextroanfetamina, poseían la capacidad de estimular el Sistema Nervioso Central (SNC) (Robledo, 2008).

Entre las sustancias psicoestimulantes más usadas se encuentran las drogas de síntesis o de diseño, que en su mayoría son derivados metoxilados de la anfetamina, como el éxtasis o 3,4-metilenodioximetanfetamina (MDMA), la píldora del amor o metilendioxianfetamina (MDA), Eva o metilenodioxietilanfetamina (MDE) (Callado, 2001; Utrilla, 2000). Estas son estimulantes del SNC, son liposolubles, atraviesa las membranas celulares y la barrera hematoencefálica (Utrilla, 2000). Las anfetaminas modifican la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisores como la dopamina (DA), serotonina (5-HT), adrenalina (A) y noradrenalina (NA) (Hyman, 1996; Utrilla, 2000). Entre los derivados de las anfetaminas que no entran en el grupo de drogas psicoestimulantes, se encuentra la p-cloroanfetamina, que se ha utilizado en modelos animales para evaluar los efectos de estas sustancias en el sistema serotoninérgico del SNC (Sanders-Bush y col., 1975; Sekerke y col., 1975).

Las anfetaminas inducen la liberación de dopamina a partir de los depósitos citoplasmáticos. En concentraciones bajas interactúa con el transportador de dopamina, se produce el intercambio anfetamina/dopamina y como consecuencia aumenta la liberación de dopamina. En altas concentraciones estas sustancias penetran en la terminal dopaminérgica, se acumula en su interior y desplaza a la dopamina de sus lugares de almacenamiento citoplasmáticos (Callado, 2001; Hyman, 1996).

En relación al sistema serotoninérgico, tanto el MDMA como el MDA, tienen afinidad moderada por los receptores a serotonina del tipo 5-HT₂. El efecto de estas sustancias se caracteriza por la liberación masiva de serotonina, seguida de una marcada disminución de la concentración de este neurotransmisor en diferentes regiones del cerebro. También se ha demostrado que las terminales axónicas degeneran, lo que se acompaña de la reducción de la inervación serotoninérgica en la neocorteza y otras estructuras del cerebro anterior (Benningfield y Cowan, 2013; Berger y col., 1990). Otro de los efectos de estas anfetaminas, es desplazar a la proteína transportadora de la serotonina, la SERT y como consecuencia inhiben la recaptura de serotonina en la terminal presináptica (Callado, 2001; Ramamoorthy y Blakely, 1999). Cuando en la rata se administra una dosis de MDMA disminuye la concentración de serotonina en el cerebro. Este efecto se le atribuye a la inhibición de la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa, limitante en la síntesis de serotonina (Benningfield y Cowan, 2013; White y col., 1996).

p-Cloroanfetamina (PCA)

La PCA es un análogo clorado de las anfetaminas (Fig. 1), que en las primeras horas después de su administración, causa liberación, seguido de la depleción de serotonina en el SNC. Una dosis de 5 mg/Kg de PCA provoca en el hipocampo la reducción del 70% de la concentración de serotonina y su metabolito, el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) (Colado y Green, 1994).

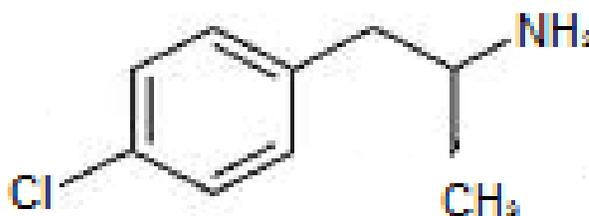


Fig. 1. Estructura química PCA (modificado de Lorenzo y Lizasoain, 2003).

A largo plazo la administración de PCA induce en el cerebro la reducción de la concentración de serotonina y de la actividad de la enzima TPH y de la recaptura de serotonina, así como degeneración de las terminales nerviosas serotoninérgicas. Estos efectos dependen de la dosis administrada (Sanders-Bush y col., 1975; Sekerke y col., 1975).

La PCA es utilizada como herramienta experimental, debido a que sus efectos sobre el sistema serotoninérgico son similares a los reportados para el MDMA o éxtasis; ambos inducen a corto plazo la liberación de serotonina de los sinaptosomas; la concentración de serotonina y su metabolito disminuyen después de una única administración de PCA y MDMA (Murlane y col., 2012).

Se sugiere que los derivados de anfetamina como la PCA ocasionan neurodegeneración en el sistema serotoninérgico. Una posible explicación a este efecto es que la administración sistémica de PCA se puede metabolizar a un componente tóxico fuera del sistema nervioso central, sin embargo, los estudios encaminados a identificar este metabolito no son concluyentes. También se sugiere que la administración sistémica de la PCA induce la formación de un metabolito tóxico a partir de la propia serotonina, debido a que se ha observado que dentro de las primeras 24 horas posteriores a la administración de la PCA, aumenta la liberación de 5-HT y ésta es transformada a un metabolito neurotóxico como la 5,6-dihidroxitriptamina o la 5,7-dihidroxitriptamina (Berger y col., 1990).

Serotonina

La serotonina es una amina biogénica, en el sistema nervioso central es un neurotransmisor, que participa en la regulación del sueño, comportamiento sexual, aumenta la motilidad intestinal y la actividad de diferentes glándulas del sistema endócrino, como el ovario y el testículo (Franco y col. 2012, Salín-Pascual, 2008, Tanaka y col., 1993). También, la deficiencia de serotonina se asocia con una serie de trastornos psiquiátricos como la esquizofrenia, depresión y la ansiedad (Muñoz y Vargas, 2004, Salín-Pascual, 2008).

El precursor de la serotonina es el L-triptófano, el cual es hidroxilado por la enzima limitante, TPH dando lugar a la formación del 5-hidroxitriptófano (5-HTP), que posteriormente es descarboxilado por la 5-hidroxitriptófano descarboxilasa, y convertido en serotonina. Esta molécula está constituida por un anillo indólico y una cadena lateral etilamino (Rang y col,

2004). La serotonina liberada en la hendidura sináptica se une a sus receptores en la célula blanco o es recapturada por la neurona que la secreta, en este proceso interviene un transportador de membrana específico para la serotonina (SERT), ya en la neurona presináptica, la serotonina es degradada por la MAO y la aldehído deshidrogenasa, al 5-HIAA (Fig. 2) (Rang y col., 2004; Salín-Pascual, 2008).

La síntesis, almacenamiento y liberación de la serotonina se lleva a cabo en el SNC, en núcleos del rafé y glándula pineal. Sin embargo, la mayor síntesis de 5-HT se produce en las células enterocromafines de la mucosa intestinal. Cerca del 95% del total de serotonina producida en el cuerpo se sintetiza en dichas células (Gershon, 2013; Linder y col., 2007), también se le encuentra en tejidos y órganos reproductivos como son el ovario y el testículo. En estos últimos se lleva a cabo la síntesis de la amina, en las células de la granulosa que rodean al ovocito y en las células de Leydig, respectivamente (Battista y Condon, 1986; Dubé y Amireault, 2007; Rang y col., 2004).

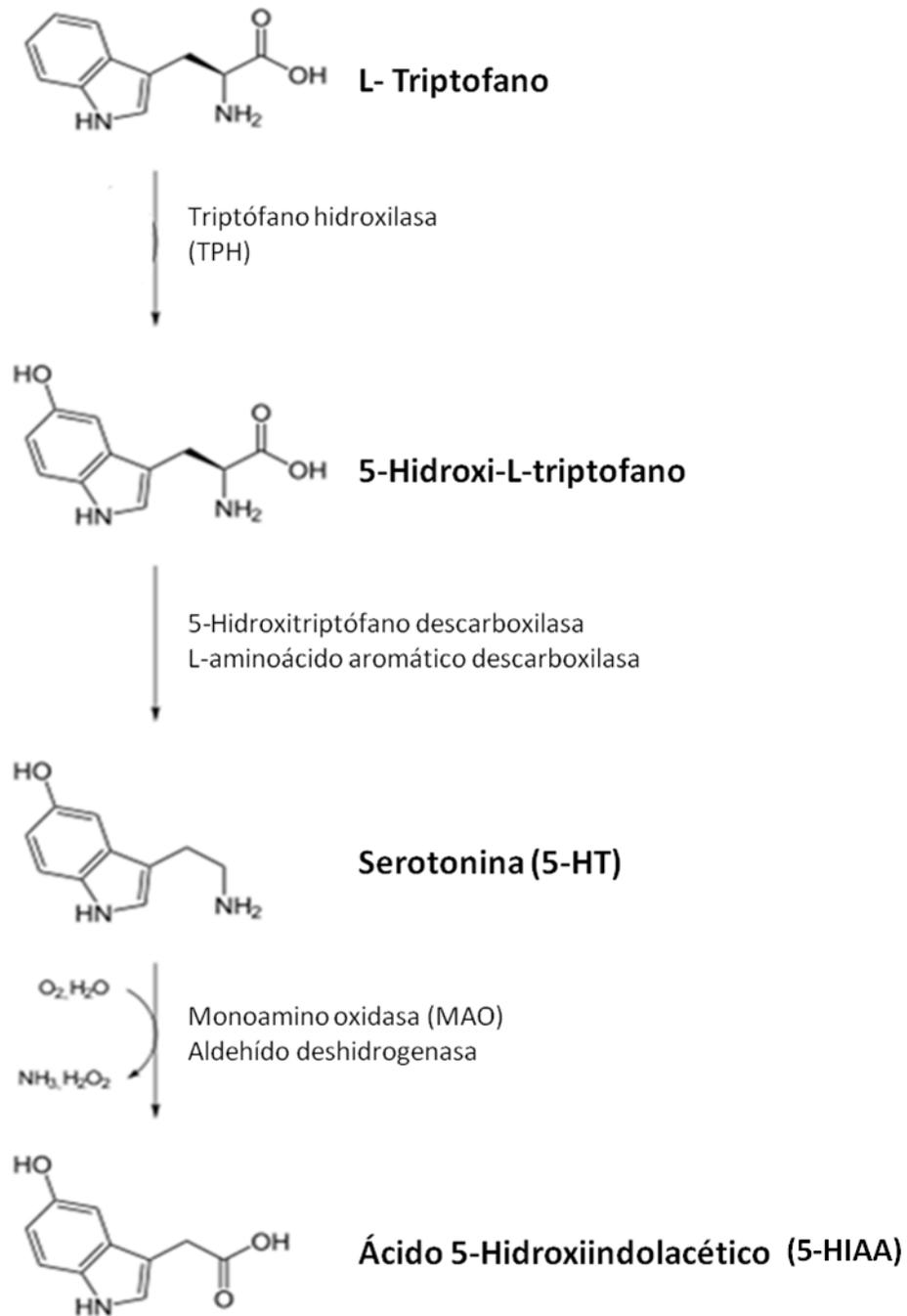


Figura 2. Síntesis y degradación de la serotonina (Modificado de Brailowsky, 2002).

En el sistema nervioso central la serotonina es sintetizada principalmente en la glándula pineal, y en los grupos de neuronas que constituyen los núcleos del rafe, que se sitúan en el tronco cerebral y que para su estudio se dividen en 9 núcleos, del B1 al B9. A partir de estos núcleos se proyectan fibras que llegan a prácticamente todo el sistema nervioso (ganglios basales, hipotálamo, tálamo, hipocampo, sistema límbico, corteza cerebral, cerebelo y médula espinal). Los paquetes de neuronas más anteriores proyectan sus fibras hacia las partes más rostrales del cerebro, mientras que las más posteriores envían sus fibras hacia las áreas del tallo cerebral y la médula espinal (Puelles y col., 2008).

Con base en criterios farmacológicos, se han descrito siete tipos de receptores de serotonina, del 5-HT₁ al 5-HT₇, cada uno de ellos con varios subtipos: A, B, C o D. En la neurona presináptica regulan la liberación de serotonina actuando como autorreceptores (5-HT₁) (Muñoz y Vargas, 2004). La mayoría de los receptores a serotonina están acoplados a proteínas G, excepto el receptor 5-HT₃, el cual es un canal iónico con especificidad para Na⁺ y K⁺ (Lorenzo y col. 2008; Lüllman y col., 2010).

La fuente de la serotonina en el ovario son las plaquetas o los mastocitos (Sirotkin y Schaeffer, 1997). Existen evidencias que plantean la posibilidad de que la serotonina se sintetice directamente en el ovario (Cortés, 2009; Dubé y Amireault, 2007). En el ratón se ha identificado en las células de la granulosa que rodean al ovocito, la triptófano hidroxilasa isoforma 1 (Dubé y Amireault, 2007). Así mismo, cuando a ratas hembras prepúberes de 30 días de edad se les administra por vía intraperitoneal o directamente en la bursa del ovario el 5-hidroxitriptófano, se incrementa significativamente la concentración de la serotonina en el ovario a los 30 ó 60 minutos posteriores a la administración del precursor (Cortés, 2009). Conjuntamente estas evidencias apoyan la idea de que en el ovario se lleva a cabo la síntesis de serotonina.

En el ovario, también se han identificado marcadores del sistema serotoninérgico, que indican que la serotonina participa en la regulación de las funciones del ovario. En el ovocito y en las células de la granulosa que lo rodean se encuentran cuatro subtipos de receptores a serotonina, el 5-HT_{1D} en ovocito; 5-HT_{2B}, 5-HT_{2A} y 5-HT₇ en granulosa. También se ha

identificado a la proteína transportadora de la serotonina que es importante en la recaptura de la amina por la célula que la sintetiza, la SERT (Dubé y Amireault, 2007).

Ovario

Los ovarios son los órganos encargados de la producción del gameto femenino (óvulo) y de la secreción de hormonas proteicas (inhibina y activina) y esteroides (progesterona, testosterona y estradiol) (Constanzo, 2000; Leung y Adashi, 2004; Tresguerres y col., 2010).

Los ovarios son estructuras pares de color blanco rosado y forma de almendra, ubicados en los lados de la cavidad pélvica, cada ovario está fijado a la superficie posterior del ligamento ancho del útero por un pliegue de peritoneo llamado mesoovario, el polo superior del ovario esta unido a la pared de la pelvis por el ligamento suspensorio, el cual conduce los vasos y los nervios ováricos. El polo inferior está unido al útero por medio del ligamento ovárico (Constanzo, 2010).

Desde el punto de vista histológico, en el ovario se encuentran una serie de estructuras bien definidas; la superficie del ovario que esta tapizada por una capa simple de células mesoteliales, inmediatamente por debajo de este epitelio se sitúa la túnica albugínea, capa de tejido conectivo denso de poco espesor y que le confiere al ovario su color blanquecino. Por debajo de esta capa se encuentran la corteza, la cual rodea a la médula, excepto en la zona hiliar que es la zona de anclaje del ovario con el mesoovario (Constanzo, 2010; Tresguerres, 2010).

La corteza es la zona periférica del ovario, contiene a los folículos ováricos en diferentes etapas del desarrollo y a los cuerpos lúteos, estos se intercalan en el estroma, que incluye tejido conectivo, células intersticiales y vasos sanguíneos. La médula contiene tejido conjuntivo laxo, fibras elásticas de colágeno, a la mayoría de los vasos sanguíneos y linfáticos y nervios (Botella, 2005).

El ovario se encuentra cubierto por una capa de tejido conjuntivo que es un repliegue del peritoneo denominado bursa ovárica, entre la bursa y el ovario se forma una cavidad que se encuentra llena del fluido que provee el microambiente hormonal necesario para los ovocitos durante el proceso de ovulación. Otra de las funciones de la bursa es contener a los ovocitos durante la ovulación y así dirigirlos hacia el oviducto, impidiendo que salgan a la cavidad abdominal (Botella, 2005; Li y col., 2007). Vanderhyden y colaboradores (1986) mostraron que en ratas adultas a las cuales se les ha removido la bursa, la cantidad de ovocitos liberados en el oviducto, es menor que en los animales intactos.

Foliculogénesis

El folículo ovárico es la unidad anatómica y funcional del ovario, cuyas funciones primordiales son liberar al ovocito capaz de ser fecundado y la secreción de hormonas, como la progesterona, testosterona y estradiol, entre otras (Arce y col., 2006; Domínguez y col., 1991).

El desarrollo folicular se clasifica en diferentes etapas, las cuales están caracterizadas por la morfología y tamaño del ovocito y el número de capas de las células de la granulosa que lo rodean. Éste proceso de foliculogénesis se lleva a cabo en la corteza del ovario y se inicia con el reclutamiento de un folículo primordial al pool de folículos en crecimiento, una vez iniciado el crecimiento éste no se detiene y culmina en la ovulación o en la atresia (Figura 3) (Domínguez y col., 1991; Edson y col., 2009; Tresguerres, 2010).

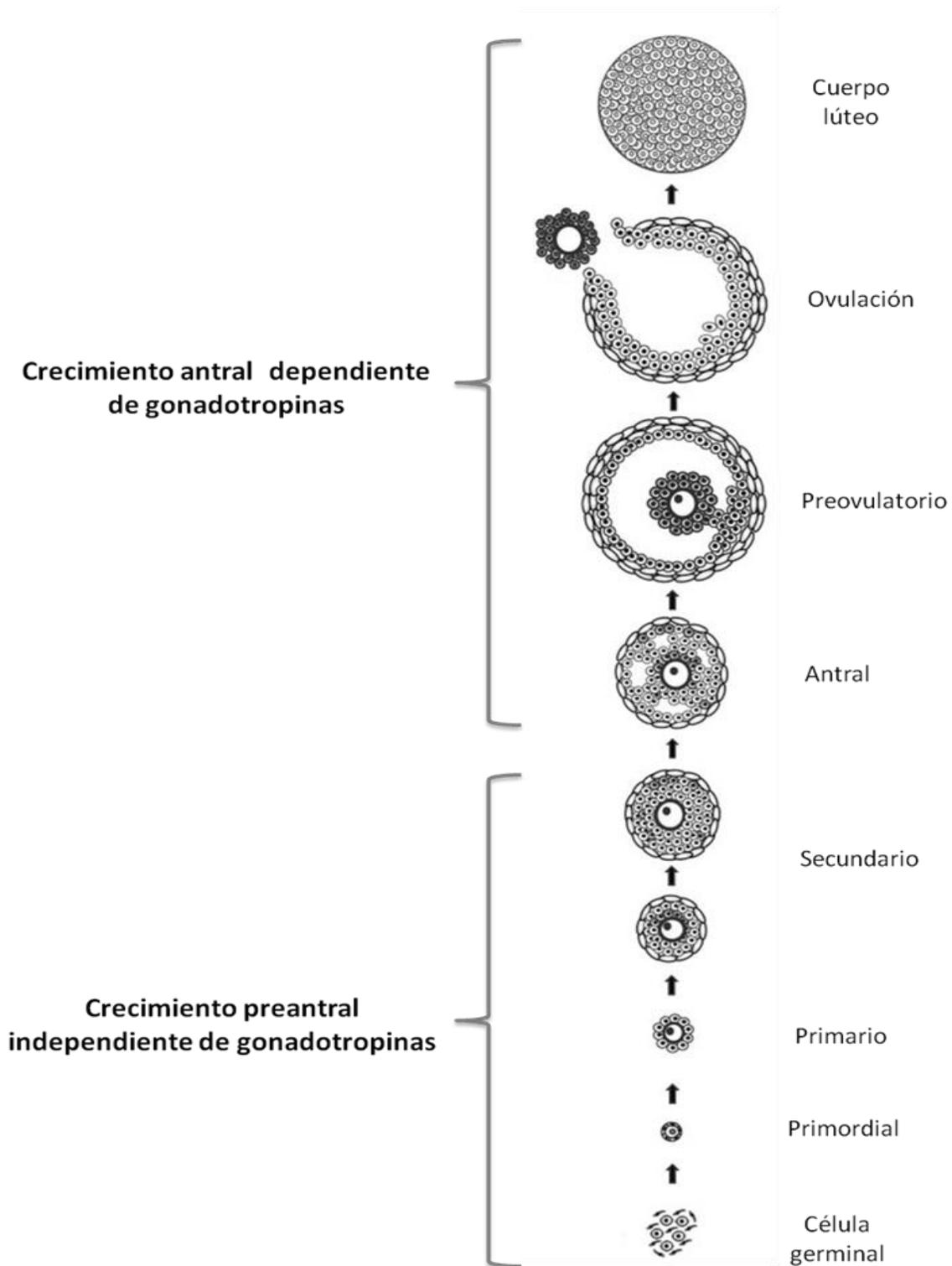


Figura 3. Etapas del desarrollo folicular (Modificada de Edson y col., 2009).

El folículo primordial está conformado por el ovocito y una capa de células aplanadas que lo rodean, las células foliculares, éste complejo ovocito-células foliculares se encuentra rodeado por la lámina basal (Constanzo, 2000; Tresguerres, 2010).

Durante la transición de folículo primordial a folículo primario, el diámetro del ovocito aumenta y las células foliculares alargadas se transforman en cúbicas y reciben el nombre de células de la granulosa. Entre los factores que participan en la transición a folículo primario se sugiere la intervención del Factor de Crecimiento y Diferenciación 9 (GDF-9) y el Ligando de Kit (KL) (Greenwald y Terranova, 1988; Uzunçü, 2007).

En el folículo primario las células de la granulosa proliferan, por lo que se da un aumento en el tamaño del folículo, las células que rodean al ovocito secretan mucopolisacáridos que forman una capa translúcida que rodea al ovocito y que se denomina membrana pelúcida (Botella, 1995; Tresguerres, 2010). Las células de la granulosa emiten prolongaciones citoplasmáticas a través de la membrana pelúcida para mantener contacto con la membrana del ovocito, por medio de uniones *gap* (Tresguerres, 2010). Además de la proliferación de las células de la granulosa, se presentan cambios en las células del estroma intersticial que rodean a los folículos y que se diferencian en células de la teca, conjuntamente todos estos cambios conducen a la formación del folículo secundario o folículo preantral. En este tipo de folículo, las células de la teca cercanas a la lámina basal forman la teca interna y las periféricas o externas mantienen la estructura alargada y se denominan células de la teca externa, esta capa es altamente vascularizada y le proporciona al folículo las hormonas y factores para su crecimiento y diferenciación (Gougeon, 1996; Lundy y col., 1999; Young y McNeilly, 2010).

En el crecimiento de los folículos participa la FSH y los estrógenos. La FSH favorece la conversión de los andrógenos a estrógenos en las células de la granulosa y en éstas, los estrógenos incrementan el número de receptores a FSH, lo que aumenta la sensibilidad de las células a la FSH (Takagi, 2007).

En el folículo en crecimiento aparecen espacios con fluido entre las células de la granulosa, los cuales al unirse forman una sola cavidad denominada antro folicular, que contiene

hormonas esteroides, neurotransmisores, inhibina, activina y factores de crecimiento, en este momento el folículo recibe el nombre de folículo antral (Gore-Langton y Armstrong, 1988). A medida que crecen los folículos, los factores locales del ovario como citocinas (IL-1) y varios factores de crecimiento (Factor de crecimiento epidérmico (EGF), Factor de crecimiento fibroblástico (FGF), Factor de crecimiento insulínico (IGF), etc.) son producidos por las células de la granulosa y la teca. Estos factores promueven o inhiben el crecimiento folicular vía mecanismos autócrinos y/o parácrinos relacionados con la producción de hormonas esteroides (Takagi, 2007).

En el folículo antral el ovocito ocupa una posición excéntrica y se encuentra rodeado por la zona pelúcida que está formada por glucoproteínas, células de la granulosa y la membrana basal (Gore-Langton y Armstrong, 1988). Las células de la granulosa entonces se diferencian en dos tipos; las células en contacto inmediato con el ovocito y que recibe el nombre de células del cumulus ooforus, y las células que recubren la pared folicular alrededor del antro se denominan células murales, éstas contienen una mayor concentración de las enzimas 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y citocromo P450arom, que participan en la ruta de síntesis de los estrógenos (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Greenwald y Terranova, 1988).

Atresia Folicular

No todos los folículos completan su desarrollo, la mayoría de las células de la granulosa de los folículos antrales presentan apoptosis, que puede culminar con la degeneración del folículo, a este proceso se le conoce como atresia folicular. Durante el proceso de atresia se presentan cambios morfológicos y bioquímicos, entre los primeros se encuentran núcleos picnóticos, desprendimiento de las células de la granulosa por la pérdida de la matriz intracelular, separación del complejo cumulus-ovocito de la pared folicular, fragmentación de la membrana basal, hipertrofia de las células de la teca y alteraciones en el ovocito. También ocurren cambios bioquímicos como pérdida de uniones comunicantes, disminución del número de receptores a las gonadotropinas en las células de la teca y de la granulosa, así como la disminución en la síntesis y expresión de ácido ribonucleico mensajero (ARNm)

para la enzima aromatasa y 17α -hidroxilasa, lo que provoca la disminución de la concentración de estrógenos y la acumulación de andrógenos inductores de la atresia del folículo (Rosales y Guzmán, 2008).

Esteroidogénesis

La esteroidogénesis en el folículo ovárico se inicia cuando la LH se une a su receptor situado en la célula de la teca. Este receptor se encuentra acoplado a proteínas G de tipo estimulantes que inducen la activación de la adenilato ciclasa, enzima que cataliza la conversión del trifosfato de adenosin (ATP) en AMPc, que actúa como segundo mensajero y estimula una cascada de señalización que activa diferentes complejos enzimáticos, entre ellos a la enzima citocromo P450_{scc} (CYP11A1), responsable de la conversión de colesterol a pregnenolona (Figura 5) (Gore-Langton y Armstrong, 1988; Gómez-Chang y col, 2012).

En el folículo ovárico el colesterol es el precursor para la síntesis de hormonas esteroideas (Cuadro 1), específicamente en las células de la teca y la granulosa, que participan de manera conjunta. Otra fuente de colesterol es el que se sintetiza *de novo* en la misma célula folicular a partir de Acetil-CoA o a partir de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) presentes en sangre, que mediante un proceso de endocitosis se incorpora al citoplasma de la célula y se traslada a la mitocondria por la proteína reguladora de la esteroidogénesis (StAR) (Hu y col, 2010; Gore-Langton y Armstrong, 1988).

Cuadro 1. Principales esteroides ováricos y sus funciones fisiológicas (Modificado de Hu y col, 2010).

Tejidos esteroidogénicos	Hormona trófica	Esteroides(s)	Función fisiológica
Célula de la Granulosa	FSH	Estradiol	Estrógeno, principal esteroide sexual producido en la hembra, necesario para el crecimiento y ovulación, responsable del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en la hembra y desarrollo neuronal
Granulosa luteinizada/ Célula luteal	LH	Progesterona	Progestágeno, necesario para el crecimiento folicular y ovulación y en el mantenimiento del embarazo temprano.
Teca-Células intersticiales	LH	Testosterona Androstenediona	Andrógeno precursor de los estrógenos, transportado al interior de las células de la granulosa, donde es convertido a estradiol por acción de la enzima aromatasa (CYP19A1).

La síntesis de esteroides sexuales se lleva a cabo por dos vías, la $\Delta 4$ o $\Delta 5$. La ruta $\Delta 4$ se produce en el cuerpo lúteo donde la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β HSD) transforma la pregnenolona a progesterona, 17-OH progesterona y andrógenos, entre estos se encuentra la androstenediona y testosterona. La ruta $\Delta 5$ ocurre preferentemente en el

folículo ya que las células de la teca son más eficientes para metabolizar la 17-OH pregnenolona, la cual es sintetizada a partir de la pregnenolona mediante la acción de la enzima 17 α -hidroxilasa (P450c17) y los andrógenos sintetizados en esta ruta son la dehidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona (Young y McNeilly, 2010). Los andrógenos de ambas rutas difunden a través de la membrana basal hasta las células de la granulosa donde la unión de la FSH a su receptor estimula la formación del adenosin monofosfato cíclico (AMPC), que a su vez activa a la enzima aromatasa (P450arom) responsable de la conversión de los andrógenos a estrógenos. En la ruta Δ 4 se sintetiza estrona y en la Δ 5 el estradiol (Figura 4) (Havelock, 2004; Cui y col, 2013).

Las hormonas esteroides regulan diversas funciones como la reproducción, mantienen los caracteres sexuales secundarios y procesos metabólicos, entre otras (Hu y col., 2010).

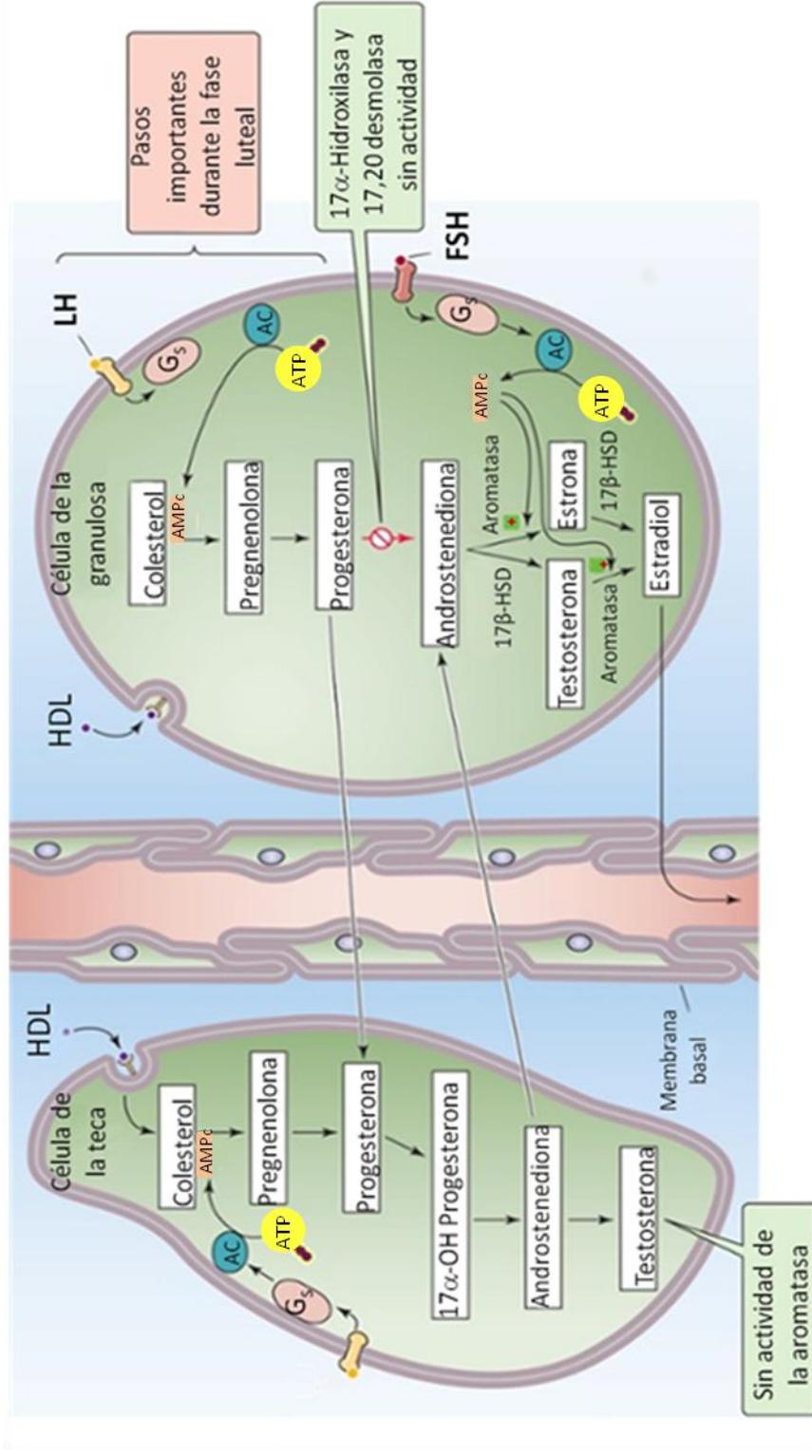


Figura 5. Síntesis de hormonas esteroideas en el folículo. Lipoproteínas de alta densidad (HDL), Hormona Luteinizante (LH), Hormona Foliculo Estimulante (FSH), 17β-Hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD), Proteína G estimulante (G_s), Adenilato ciclasa (AC), Adenosin trifosfato (ATP), Adenosin monofosfato cíclico (AMPc) (Modificado de Boron & Boulpaep, 2012).

Regulación hormonal de las funciones del ovario

El hipotálamo, región del sistema nervioso central que secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) hacia el sistema portal-hipotálamo-hipofisiario y es transportada hasta los gonadotropos, donde se une a sus receptores de membrana y desencadena una cascada de señalización que culmina con la síntesis y liberación de las gonadotropinas, FSH y LH (Botella, 1995). La FSH y LH son hormonas glicoproteicas formadas por dos subunidades (α y β), que se unen a sus receptores de membrana en las células de la granulosa o la teca respectivamente y regulan el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico, la ovulación y la secreción de hormonas esteroides. Éstas últimas actúan como factores intraováricos que regulan su funcionamiento (Botella, 1995; Edson y col. 2009; Filicori, 1999).

Serotonina y Ovario

Además de la acción de la FSH, LH y los estrógenos en la regulación de las funciones del ovario, también participan otros factores como la oxitocina, hormona del crecimiento (GH), Factor de Crecimiento Similar a la Insulina de tipo I (IGF-I), las aminas biogénicas como la serotonina y la inervación que recibe la gónada. La serotonina modula la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas en el hipotálamo y de las gonadotropinas en la hipófisis. (Gouveia y Rodrigues, 2004; Justo y col, 1989; Tanaka y col, 1993).

En el animal prepúber, a la serotonina se le ha implicado en la regulación de las funciones del ovario. Ayala y colaboradores (1993) mostraron que en la rata de 30 días de edad, la serotonina participa en la modulación de la secreción de la LH y en la primera ovulación. Mientras que, en el ovario ejerce un efecto inhibitorio, debido a que cuando a ratas de la misma edad se les administra serotonina vía sistémica, disminuye la concentración de estradiol en el suero y se incrementa la atresia folicular (Morán y col., 2012).

Entre las evidencias que apoyan la participación de la serotonina en la regulación de las funciones del ovario, se encuentran los resultados de Clausell y Soliman (1977), quienes mostraron que en ratas adultas cíclicas la concentración de serotonina en el ovario aumenta

significativamente durante el estro. Así mismo, en la hembra prepúber, Schmidt y colaboradores (1988), mostraron que cuando los ovarios de ratas tratadas con gonadotropina del suero de la yegüa preñada (PMSG) son mantenidos en un medio de perfusión al que se le agrega serotonina, se produce la ovulación, mientras que cuando además de serotonina se agrega metisergide (bloqueador de los receptores a serotonina del tipo 5-HT_{2A}) se inhibe. Con base en estas observaciones los autores sugieren que la serotonina participa en el proceso de inflamación local que precede a la ruptura del folículo durante la ovulación.

En otros estudios se mostró que la administración oral de ketanserina (un antagonista selectivo a los receptores 5-HT₂) a ratas adultas en el día del proestro, resultó en la disminución significativa de las concentraciones de estradiol y progesterona en suero, en comparación con el grupo testigo (Tanaka y col., 1993). En otro experimento se mantuvieron *in vitro* células de la granulosa obtenidas de folículos de mujer, a las cuales se les adicionó serotonina y se observó aumento en la producción de progesterona y estradiol (Bódis y col., 1992).

Battista y Condon (1986) mostraron que cuando a células de cuerpo lúteo de vaca mantenidas *in vitro*, se les adiciona serotonina, se incrementa la concentración de progesterona. Mientras que, cuando conjuntamente con serotonina se le administra mianserina (antagonista a los receptores 5-HT₁ y 5-HT₂) la concentración de progesterona disminuye.

Inervación ovárica y esteroidogénesis

El ovario recibe inervación e irrigación, que entra por el hilio. La irrigación proviene principalmente de la arteria ovárica, que es una rama de la aorta abdominal, y de la arteria útero ovárica, que nace de la arteria uterina a la altura del cuerpo uterino. El ovario es inervado por fibras nerviosas extrínsecas simpáticas que transcurren por el plexo ovárico y por el nervio ovárico superior (NOS), así como por fibras sensoriales que provienen del nervio vago (Lawrence y Burden, 1980). La inervación simpática se origina en las neuronas preganglionares que se localizan en la médula a la altura de los segmentos medulares Torácico 11 (T11) a Lumbar 4 (L4) (Dissen y Ojeda, 1999; Yao y Bahr, 1999)

De esta región se proyectan axones que establecen contacto con el grupo de neuronas de los ganglios celiaco y mesentérico superior. El plexo ovárico, en mayor proporción proviene del plexo aórtico e incluye fibras derivadas del plexo renal mesentérico y lumbar (Yao y Bahr, 1999; Dissen y Ojeda, 1999). Las terminales de las fibras que inervan el ovario liberan neurotransmisores al interior de la gónada, como la noradrenalina (NA) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), que son considerados como reguladores de la esteroidogénesis y del desarrollo folicular temprano (Dissen y Ojeda, 1999).

Además de la inervación extrínseca, el ovario también tiene inervación intrínseca, en el mono Rhesus se ha mostrado la presencia de inervación intrínseca que proviene de células con apariencia similar a la de una neurona, la presencia de inervación intrínseca también se ha demostrado recientemente en la rata Wistar (D'Albora y Barcia, 1996; D'Albora y col., 2000). Aunado a esto, algunas de estas células fueron positivas a la tirosina hidroxilasa, lo que indica que estas células son catecolaminérgicas (Dees y col., 1995). Posteriormente se demostró que en estas células se expresa el gen que codifica para la enzima dopamina- β -hidroxilasa, que transforma la dopamina en noradrenalina (Mayerhofer y col., 1998). Las neuronas ováricas y sus fibras se localizan en la corteza y médula del ovario del mono Rhesus. Específicamente, las fibras inervan la teca de los folículos en crecimiento y ocasionalmente se ha observado que inervan a los folículos primordiales (Dees y col., 1995), mientras que en la médula inervan los vasos sanguíneos.

Se ha observado que los nervios ováricos pueden facilitar el desarrollo prepuberal ovárico, desde el nacimiento se ha encontrado que la NA y el VIP estimulan la esteroidogénesis, esta inferencia es apoyada por la demostración de que la densidad de fibras catecolaminérgicas y VIPérgicas en ovario de mono se incrementa significativamente entre el periodo neonatal y puberal. Se sabe que tanto la NA como el VIP estimulan la esteroidogénesis ovárica, ambos promueven la secreción de progesterona y andrógenos, pero únicamente el VIP estimula la producción de estradiol (Dissen y Ojeda, 1999). Estudios recientes han demostrado que además de participar en la esteroidogénesis, la NA y el VIP también contribuyen en la diferenciación bioquímica de los folículos recién formados, mediante la estimulación de la formación de los receptores a FSH, generando la capacidad del folículo para responder a la acción de las gonadotropinas (Mayerhofer y col., 1997).

JUSTIFICACIÓN

En la hembra, la serotonina participa en la modulación del funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis y como consecuencia en el funcionamiento de los ovarios, particularmente en la ovulación. Además se ha mostrado que en el ovario se encuentra un sistema serotoninérgico que posiblemente participe en la regulación de las funciones de la gónada, sin embargo, no existen evidencias concluyentes que apoyen esto. Por ello, en el presente trabajo se analizó en la rata hembra prepúber el efecto de la inhibición de la síntesis de serotonina en el ovario inducido por la administración de un derivado de las anfetaminas, la p-cloroanfetamina, directamente en la bursa del ovario sobre la concentración de serotonina, noradrenalina y dopamina en la gónada y en el desarrollo folicular, así como en la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero.

Los resultados generados en el presente proyecto permitirán avanzar en el conocimiento sobre los efectos que pueden ejercer algunos inhibidores del sistema serotoninérgico, como las anfetaminas o sus derivados que se utilizan como drogas recreacionales o para el tratamiento de trastornos como depresión, ansiedad, insomnio, en el control de peso y en problemas de déficit de atención en niños.

HIPÓTESIS

La serotonina que se sintetiza en el ovario, ejerce un efecto estimulante en la secreción de estradiol. Por lo que, la inhibición del sistema serotoninérgico del ovario inducido por la administración de la PCA, provocará disminución en la secreción de progesterona y estradiol, lo que se acompañará en alteraciones en el desarrollo del folículo.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos de la inhibición del sistema serotoninérgico del ovario inducido por la administración de PCA directamente en la bursa del ovario sobre el sistema serotoninérgico, en la concentración de noradrenalina, dopamina, de progesterona, testosterona, estradiol y en el desarrollo folicular.

OBJETIVOS PARTICULARES

Evaluar en la rata hembra prepúber los efectos de la administración de PCA en la bursa del ovario sobre la concentración de serotonina y del ácido 5-hidroxiindolacético en este órgano.

Evaluar en la rata hembra prepúber los efectos de la administración de PCA en bursa del ovario en la concentración de noradrenalina y del ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) en este órgano.

Evaluar en la rata hembra prepúber los efectos de la administración de PCA en bursa del ovario en la concentración de dopamina y del ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC) en este órgano.

Analizar los efectos de la administración de PCA en la bursa del ovario en la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en el suero de la rata hembra prepúber.

Evaluar los efectos de la administración de PCA en la bursa del ovario en el desarrollo folicular en la rata hembra prepúber.

MATERIALES Y MÉTODO

Animales

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV de 30 días de edad en condiciones controladas de iluminación (14 horas luz/10 horas de oscuridad), con libre acceso al agua y alimento. Las crías tuvieron libre acceso a la madre hasta el destete (a los 21 días de edad).

Grupos Experimentales

Las ratas utilizadas fueron divididas al azar en tres grupos de 10 animales cada uno. A un grupo de ratas se le administró 40 μ L de solución salina (VH) al 0.9% directamente en bursa del ovario, a otro grupo se le inyectó 40 μ L de PCA en una dosis de 0.1 mg/ovario. La dosis de PCA que se inyectó se calculó con base en el peso que tiene el ovario de las hembras de 30 días y lo reportado por Sanders-Bush y colaboradores (1975), quienes señalan que una dosis de 10 mg/Kg p.c. induce inhibición de la enzima triptófano hidroxilasa y la disminución en la concentración de serotonina. Otro grupo de comparación fue el de animales sin ningún tratamiento, testigo absoluto.

Administración de PCA o de vehículo en bursa del ovario

Los animales fueron anestesiados con éter, se realizaron incisiones laterales de piel y músculo y se exteriorizó primero el ovario izquierdo. La administración de los 40 μ L de fármaco o del VH se realizó con una aguja (8mm/31G) en un lapso de un minuto. Concluida la administración, la jeringa se dejó un mínimo de 1 minuto dentro de la bursa del ovario con la finalidad de que la PCA difundiera al tejido ovárico, concluida la inyección se retiró la aguja, se suturó músculo y piel y se realizó el mismo procedimiento en el ovario derecho.

Procedimiento de sacrificio de animales

Los grupos de animales de los diferentes grupos experimentales se sacrificaron por decapitación a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento. Se colectó la sangre del tronco y se dejó reposar durante 15 minutos, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 20 minutos. El suero se separó en tubos ependorf previamente etiquetados y se almacenaron a -20°C para la posterior cuantificación de hormonas esteroides por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

En el momento de la autopsia se extrajeron los ovarios. El ovario izquierdo fue fijado por inmersión en solución de Bouin para su posterior estudio histológico y el ovario derecho se almacenó a -72°C para la posterior cuantificación de serotonina, noradrenalina, dopamina y sus respectivos metabolitos, 5-HIAA, MHPG y DOPAC, con la técnica de cromatografía líquida de alta presión o HPLC.

Cuantificación de serotonina, noradrenalina, dopamina y sus metabolitos

Los ovarios se pesaron, se colocaron en tubos ependorf y homogeneizaron individualmente en 300µL de ácido perclórico (HCl_3O_4) a una concentración de 0.1 N. Posteriormente las muestras se centrifugaron a 1200 rpm a una temperatura de -4°C durante 30 minutos. El sobrenadante se filtró utilizando filtros con un tamaño de poro de 45 micrómetros y con ayuda de una jeringa Hamilton de 100 µL la muestra filtrada se inyectó en el sistema de HPLC previamente calibrado. La concentración de serotonina, noradrenalina, dopamina y de sus metabolitos se expresó en ng/mg de tejido. La sensibilidad del método para la detección de las aminas y metabolitos es de 0.001 ng/mg de tejido.

Cuantificación de hormonas esteroides

La cuantificación de hormonas esteroides (progesterona, testosterona y 17β -estradiol) se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA). Para ello se utilizó un kit Coat-A-Count,

USA (Diagnostic Products, Los Ángeles, CA, USA). La concentración de progesterona se expresó en ng/mL de suero y la de testosterona y 17 β -estradiol en pg/mL de suero.

Estudio histológico

Fijado e inclusión del ovario

Los ovarios de los animales de los diferentes grupos experimentales se fijaron por inmersión en solución de Bouin por 24 horas, posteriormente el fijador se eliminó al realizar un lavado con alcohol al 70%. Los ovarios se deshidrataron con alcohol a diferentes concentraciones, 70%, 96%, 100% y por último con cloroformo. Una vez deshidratado el órgano, se incluyó en parafina y se realizaron bloques de parafina que contenían los ovarios (Figura 6).

Cortes, montaje y tinción

Con ayuda de un micrótopo se realizaron cortes seriados del ovario a un grosor de 10 μ m, que se colocaron en portaobjetos previamente etiquetados y preparados con albúmina. Los cortes de ovario se tiñeron con la técnica de Hematoxilina-Eosina. Una vez teñidos, los cortes teñidos se cubrieron con bálsamo de Canadá y un cubreobjetos para preservar la calidad y coloración del preparado hasta la posterior evaluación de la población folicular (Figura 7).

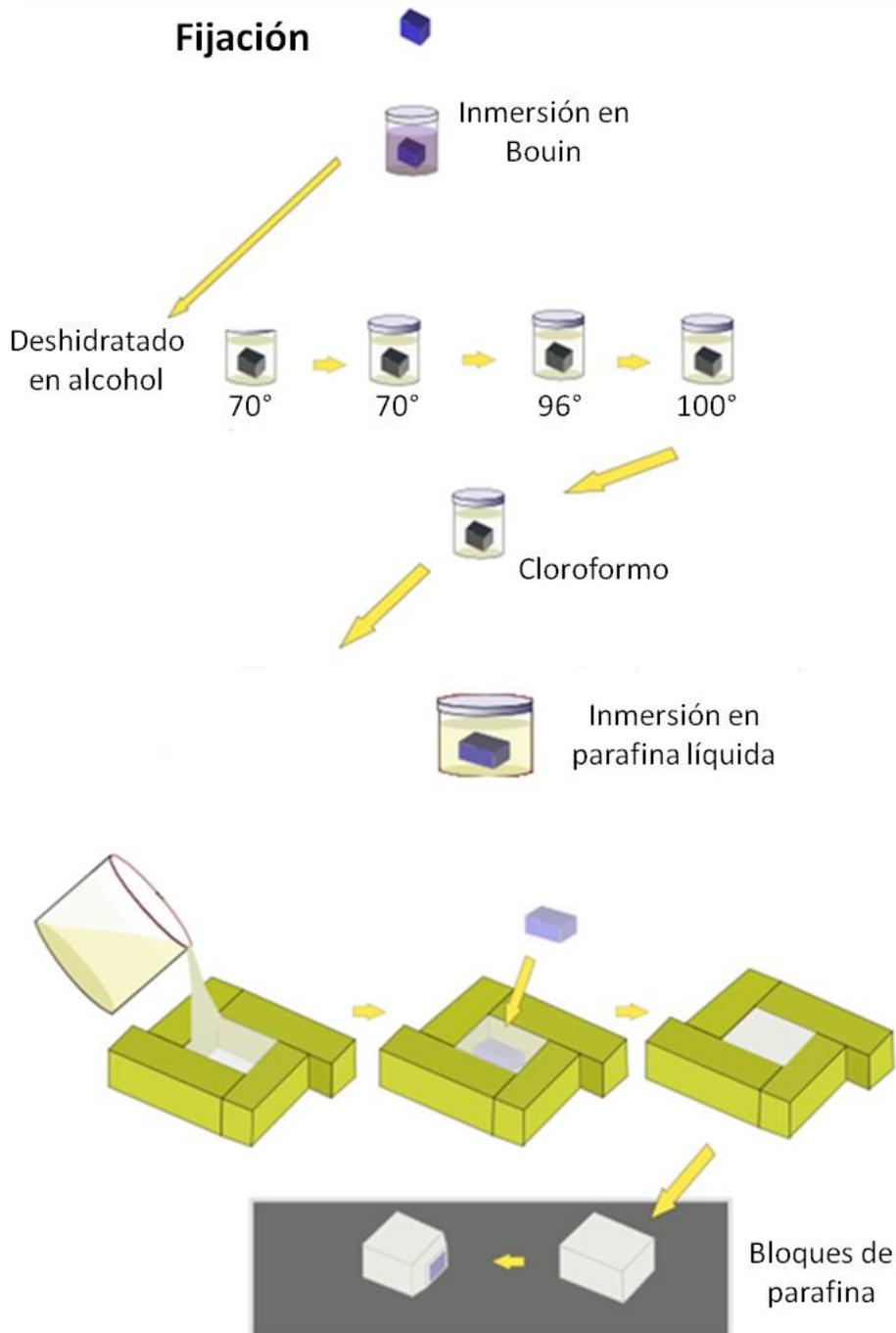


Figura 6. Procedimiento de fijación e inclusión del ovario en parafina (Modificado de Molist y col., 2011).

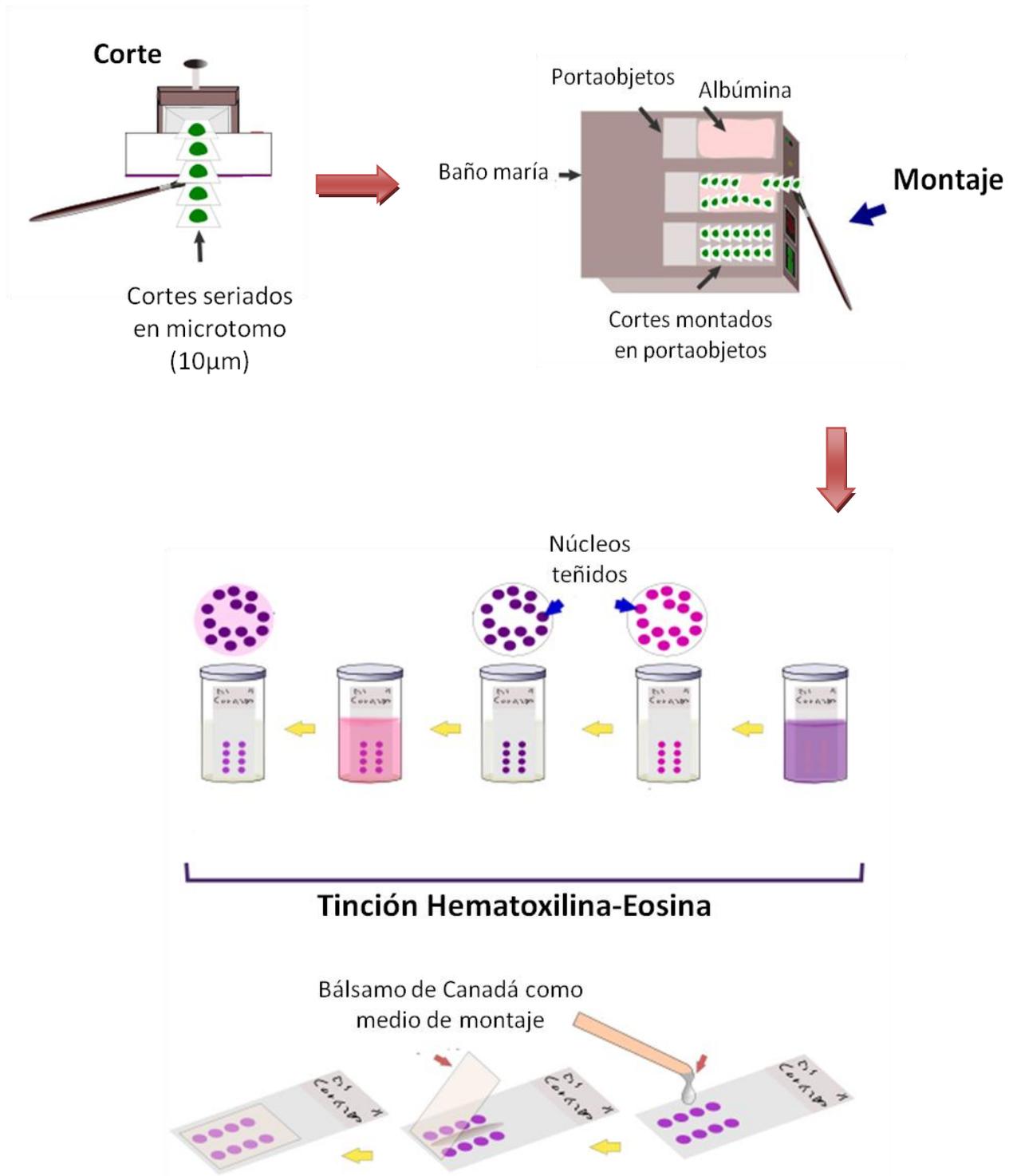


Figura 7. Procedimiento de corte, montaje y tinción del ovario (Modificado de Molist y col., 2011).

Análisis de la estructura y población folicular

Se revisaron cada uno de los cortes y con la ayuda de un ocular micrométrico y un microscopio óptico, se midió el diámetro mayor y el perpendicular a éste, en todos los folículos que presentaron el núcleo y el nucléolo del ovocito bien definidos. Así mismo se analizó el estado de los folículos, si eran sanos o presentaban por lo menos una de las siguientes características de atresia folicular: picnosis de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa en el antro folicular, engrosamiento de la teca, alteraciones en el ovocito y aquellos que presentaran dos características de las anteriores. Con los diámetros medidos se realizó el cálculo del diámetro promedio de cada folículo con la siguiente relación:

$$\text{Diámetro promedio} = \frac{D1 + D2}{2}$$

Una vez calculado el diámetro promedio, los folículos se clasificaron de acuerdo al tamaño en: pequeños (clase 1) de 70 a 200µm, medianos (clase 2) de 200 a 400µm y preovulatorios (clase 3), los mayores a 400µm.

Análisis estadístico

Los resultados de concentración de progesterona, testosterona, estradiol, así como de la serotonina, noradrenalina, dopamina y sus metabolitos en el ovario, se analizaron con la prueba “t” de Student. La población folicular se expresó en porcentaje y se analizó por la prueba de Ji-Cuadrada. Se consideraron como diferencias significativas cuando la p fue menor o igual a 0.05.

RESULTADOS

1.- Efecto de la administración de solución salina 0.9% (VH) en bursa del ovario.

- *Concentración de serotonina y su metabolito.*

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto (TA), en el ovario de los animales que fueron inyectados con vehículo, se observó incremento significativo en la concentración de serotonina en todos los periodos estudiados. Un comportamiento inverso se observó en la concentración del metabolito a las 72 y 96 horas después del tratamiento (Cuadro 2).

Cuadro 2: Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario de rata hembra sin tratamiento (TA) o con inyección de solución salina (VH) en la bursa del ovario y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

Grupo		n	5-HT	5-HIAA
48 h	TA	10	0.32 \pm 0.05	0.19 \pm 0.03
	VH	8	0.93 \pm 0.12 a	0.09 \pm 0.01
72 h	TA	10	0.35 \pm 0.09	0.17 \pm 0.02
	VH	10	0.85 \pm 0.22 a	0.06 \pm 0.01 a
96 h	TA	10	0.34 \pm 0.03	0.14 \pm 0.02
	VH	9	0.47 \pm 0.04 a	0.08 \pm 0.01 a
120 h	TA	9	0.47 \pm 0.06	0.13 \pm 0.01
	VH	9	0.79 \pm 0.11 a	0.1 \pm 0.01

a, p <0.05 vs TA (Prueba "t" de student)

- *Concentración de Noradrenalina y su metabolito.*

La concentración de NA se incrementó significativamente en los animales que se les inyectó el VH en la bursa del ovario y sacrificados a las 48 horas, en comparación con el grupo de animales testigo absoluto, mientras que a las 72 horas se observó un comportamiento inverso. A las 96 y 120 horas no se observaron cambios significativos. En algunos de los periodos evaluados no se cuantificó la concentración del metabolito de NA, el MHPG, debido a que se encontraba por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/mg de tejido), por lo que no fue posible indicar si se presentaron cambios (Cuadro 3).

Cuadro 3: Media \pm e.e.m. de la concentración de noradrenalina (NA) y de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en el ovario de rata hembra sin tratamiento (TA) o con inyección de solución salina (VH) en la bursa del ovario y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

Grupo		n	NA ng/mg de tejido	MHPG
48 h	TA	10	0.36 \pm 0.06	*
	VH	8	0.64 \pm 0.06 a	*
72 h	TA	12	0.70 \pm 0.15	*
	VH	10	0.42 \pm 0.04 a	0.19 \pm 0.01
96 h	TA	10	0.52 \pm 0.14	0.12 \pm 0.02
	VH	9	0.48 \pm 0.08	*
120 h	TA	11	0.85 \pm 0.18	*
	VH	10	0.64 \pm 0.10	*

* , valor por debajo de la sensibilidad del método

a, p <0.05 vs TA (Prueba "t" de student)

- *Concentración de Dopamina y su metabolito*

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto (TA), en el ovario de los animales que fueron inyectados con VH en la bursa del ovario y sacrificados a las 72 ó 120 horas después del tratamiento, se observó incremento significativo en la concentración de dopamina; mientras que en el resto de los periodos evaluados no se observaron cambios significativos. En cuanto al metabolito no se observaron cambios significativos en ningún periodo (Cuadro 4).

Cuadro 4: Media \pm e.e.m. de la concentración de dopamina (DA) y del ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) en el ovario de rata hembra sin tratamiento (TA) o con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

Grupo		n	DA ng/mg de tejido	DOPAC
48 h	TA	10	*	*
	VH	8	0.04 \pm 0.01	0.15 \pm 0.02
72 h	TA	12	0.26 \pm 0.14	0.06 \pm 0.01
	VH	10	0.70 \pm 0.17 a	0.11 \pm 0.05
96 h	TA	10	*	0.03 \pm 0.01
	VH	9	0.37 \pm 0.18	*
120 h	TA	11	0.11 \pm 0.04	0.05 \pm 0.01
	VH	10	0.63 \pm 0.21 a	*

* , valor por debajo de la sensibilidad del método

a, p <0.05 vs TA (Prueba "t" de student)

- *Concentración de hormonas esteroides.*

En comparación con el testigo absoluto, la concentración de progesterona en el suero de los animales tratados con vehículo disminuyó significativamente a las 48 y 72 horas después de tratamiento, la de testosterona disminuyó a las 48 y 96 horas, mientras que la concentración de estradiol disminuyó en todos los periodos evaluados (Cuadro 5).

Cuadro 5: Media ± e.e.m. de la concentración de progesterona, testosterona y estradiol en suero de ratas hembra sin tratamiento (TA) o con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

Grupo		PROGESTERONA	TESTOSTERONA	ESTRADIOL
		ng/mL de suero	pg/mL de suero	
48 h	TA	5.36±0.75	27.518±6.524	21.13±1.50
	VH	1.88±0.32 a	11.421±2.190 a	5.99±0.38 a
72 h	TA	6.82±0.76	22.287±6.785	20.57±2.05
	VH	4.00±0.75 a	11.588±2.725	7.24±1.40 a
96 h	TA	5.20±1.20	52.078±13.243	24.78±1.55
	VH	3.25±0.64	16.154±9.095 a	9.20±2.07 a
120 h	TA	6.81±1.37	38.854±13.246	23.13±2.33
	VH	3.86±0.94	24.812±11.335	10.24±2.58 a

a, p <0.05 vs TA (Prueba "t" de student)

- *Población folicular.*

El porcentaje de folículos totales en el ovario de los animales tratados con VH no se modificó significativamente en ninguno de los periodos evaluados, en comparación con los animales testigo absoluto (datos no mostrados).

Debido a que en los animales tratados con vehículo se observaron cambios en algunos de los parámetros evaluados (como son concentración de serotonina, dopamina y hormonas esteroides) en comparación con el testigo absoluto, los efectos de la administración de PCA se analizaron comparando con su respectivo grupo con vehículo.

2.-Efecto de la administración de PCA en la bursa del ovario.

- *Concentración de serotonina y su metabolito.*

La concentración de 5-HT en el ovario derecho de los animales tratados con PCA disminuyó significativamente a las 48 horas después del tratamiento en comparación con el grupo vehículo, mientras que en el resto de los periodos evaluados no se presentaron cambios significativos. En cuanto a la concentración del 5-HIAA se observó incremento en la concentración en el mismo periodo y a las 96 h, mientras que no se observaron cambios significativos en el resto de los periodos evaluados (Figura 8).

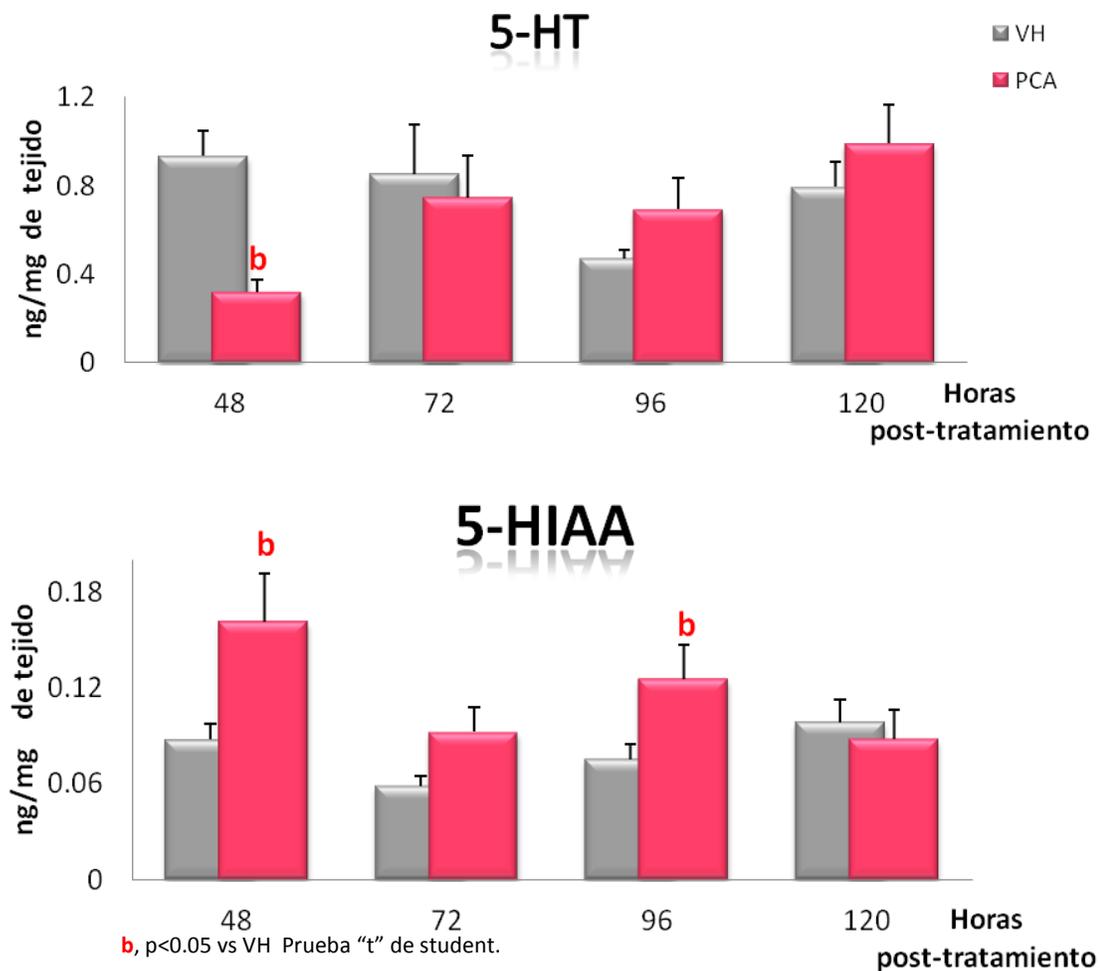


Figura 8: Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el ovario derecho de ratas hembra inyectadas con solución salina en bursa del ovario ó con 0.1 mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

- *Concentración de noradrenalina y su metabolito.*

No se observaron cambios significativos en la concentración de NA en el ovario derecho de los animales que se les inyectó la PCA en comparación con los que recibieron VH. En el ovario derecho de los animales que se les inyectó el VH y sacrificados a las 48, 96 y 120 horas, la concentración del metabolito, el MHPG, estuvo por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng/mg de tejido). Finalmente en los animales sacrificados a las 72 horas este metabolito únicamente se cuantificó en dos animales (Figura 9).

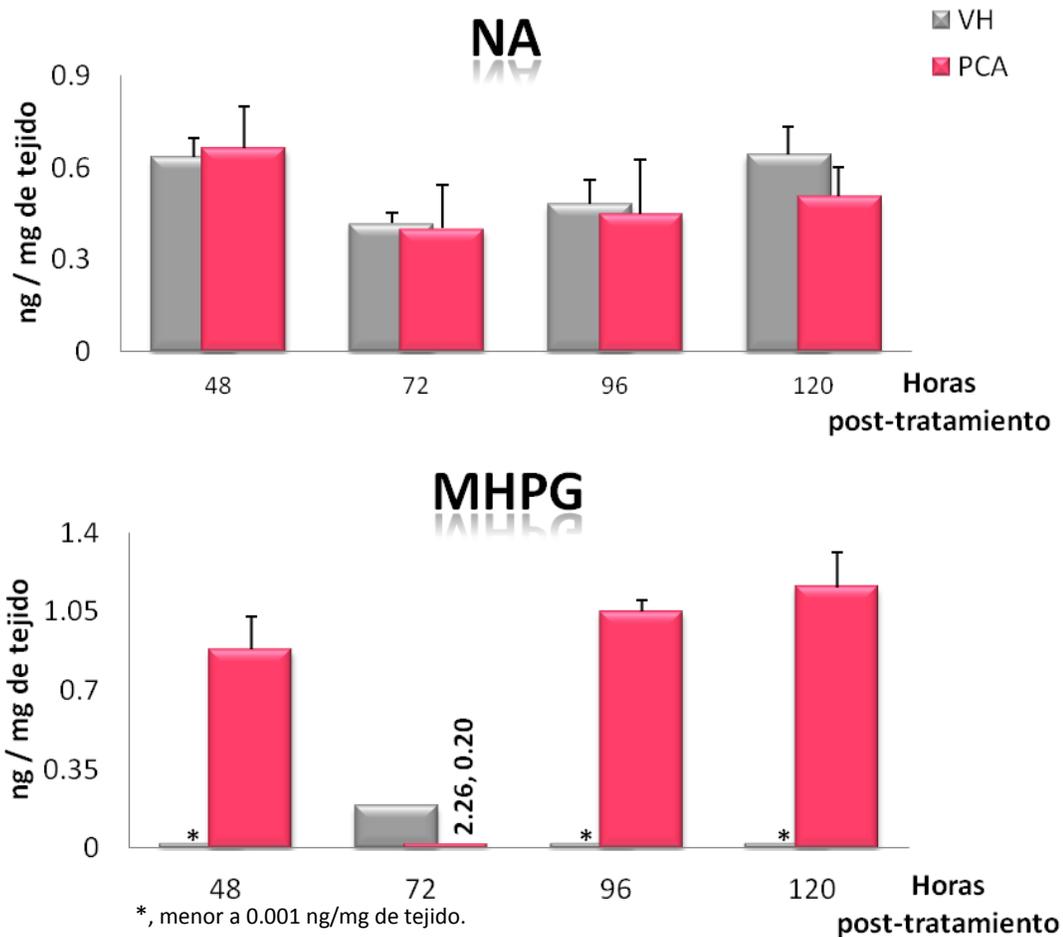


Figura 9: Media \pm e.e.m. de la concentración de noradrenalina (NA) y de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en el ovario derecho de ratas hembra con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario ó con 0.1 mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

- *Concentración de dopamina y su metabolito.*

En comparación con el grupo de animales que se les inyectó el VH, en los que se les administró la PCA, la concentración de DA en el ovario derecho aumentó significativamente a las 48 horas después del tratamiento y un comportamiento inverso se observó a las 72 horas, en tanto que a las 96 y 120 horas la concentración de este neurotransmisor estuvo por debajo de la sensibilidad del método (0.001 ng) (figura 10).

En el ovario derecho de los animales que se les administró la PCA y sacrificados a las 48 horas, el DOPAC estuvo por debajo de la sensibilidad del método, a las 72 horas no se observaron cambios en comparación con el grupo de animales que se les administró la PCA, mientras que a las 96 y 120 horas la concentración de este metabolito se incrementó (Figura 10).

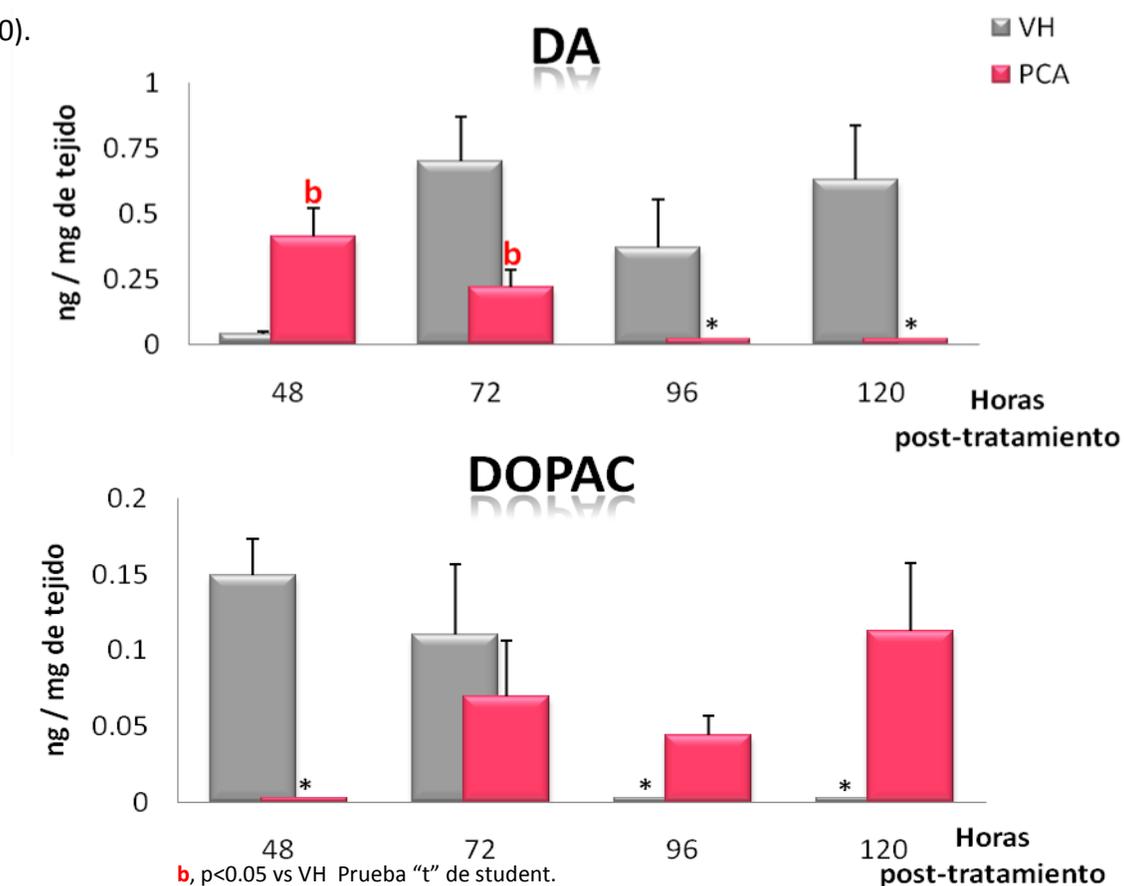


Figura 10: Media \pm e.e.m. de la concentración de dopamina (DA) y del ácido dihidroxifenilacético (DOPAC) en el ovario derecho de ratas hembra con inyección de solución salina en bursa del ovario o con 0.1 mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

- *Concentración de hormonas esteroides.*

En los animales tratados con PCA aumentó la concentración de progesterona en el suero a las 48 horas en comparación con el grupo vehículo; mientras que la concentración de testosterona no se modificó significativamente (Figuras 11 y 12). El estradiol disminuyó significativamente en todos los periodos evaluados (Figura 13).

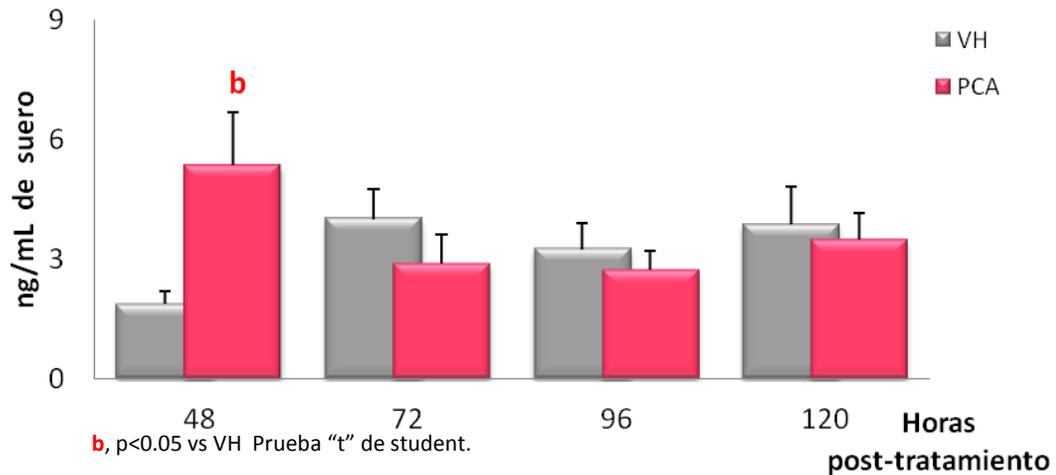


Figura 11: Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona en el suero de ratas hembra con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario o con 0.1 mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

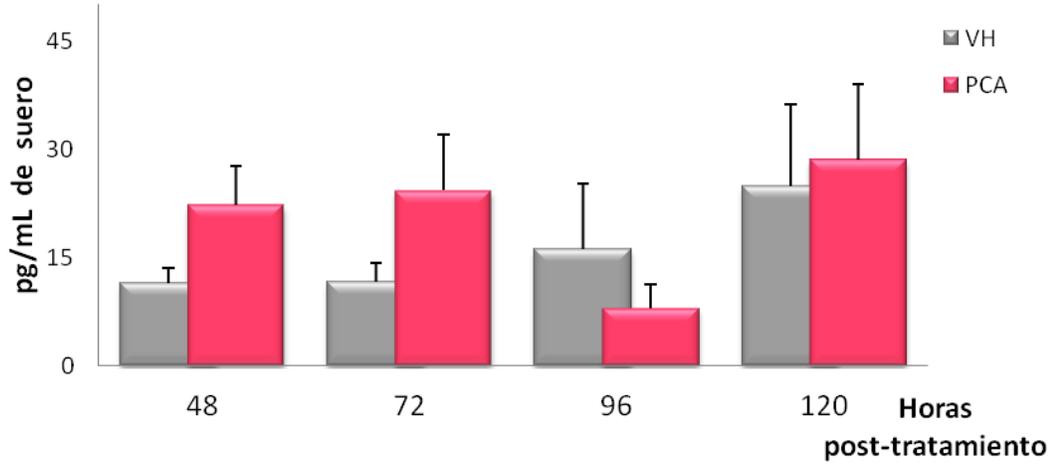


Figura 12: Media \pm e.e.m. de la concentración de testosterona en el suero de ratas hembra con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario o con 0.1 mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

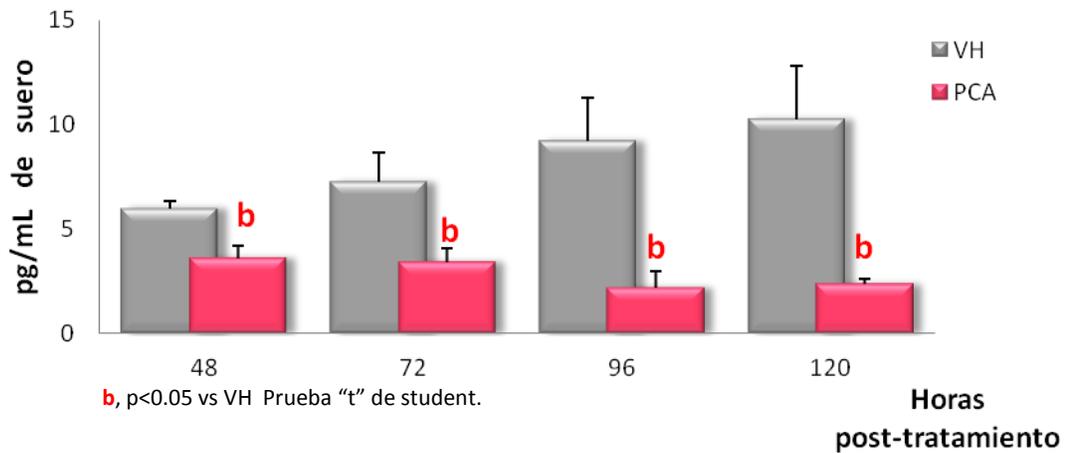


Figura 13: Media \pm e.e.m. de la concentración de estradiol en el suero de ratas hembra con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario o con 0.1 mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

- *Población folicular.*

En comparación con el grupo de animales tratados con vehículo, en el ovario de los animales que se les inyectó la PCA, el porcentaje de folículos totales no se modificó significativamente en ninguno de los periodos evaluados. Cuando se analizó el estado de los folículos, se observó que el porcentaje de folículos atrésicos es mayor en todos los periodos evaluados en comparación con su respectivo grupo vehículo (Cuadro 6).

Cuadro 6: Número de folículos totales y porcentaje de folículos atrésicos totales en el ovario de ratas hembra tratadas con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario o con 0.1 mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 ó 120 horas después del tratamiento.

Grupo		Folículos totales	Folículos Atrésicos totales
48 h	VH	75	20%
	PCA	67	37% b
72 h	VH	65	22%
	PCA	56	52% b
96 h	VH	71	21%
	PCA	78	47% b
120 h	VH	107	22%
	PCA	114	46% b

b, p<0.05 vs VH (Ji-Cuadrada)

En el análisis de la población de folículos por tamaño, se observó que en los animales tratados con PCA y sacrificados a las 96 horas disminuyó significativamente los folículos clase 1 ($<200\mu\text{m}$), mientras que en el porcentaje de folículos de clase 2 ($200-400\mu\text{m}$) se observó un comportamiento inverso, sin cambios en los folículos de clase 3 ($>400\mu\text{m}$) (Figura 14).

En el ovario de los animales tratados con PCA, el porcentaje de los folículos atrésicos de las clases 1 aumentó significativamente en todos los periodos evaluados a excepción de los animales sacrificados a las 96 horas; en comparación con sus respectivos grupos vehículo. Este mismo comportamiento se observó en los folículos atrésicos de clase 2 y 3 en todos los periodos evaluados (Figura 15).

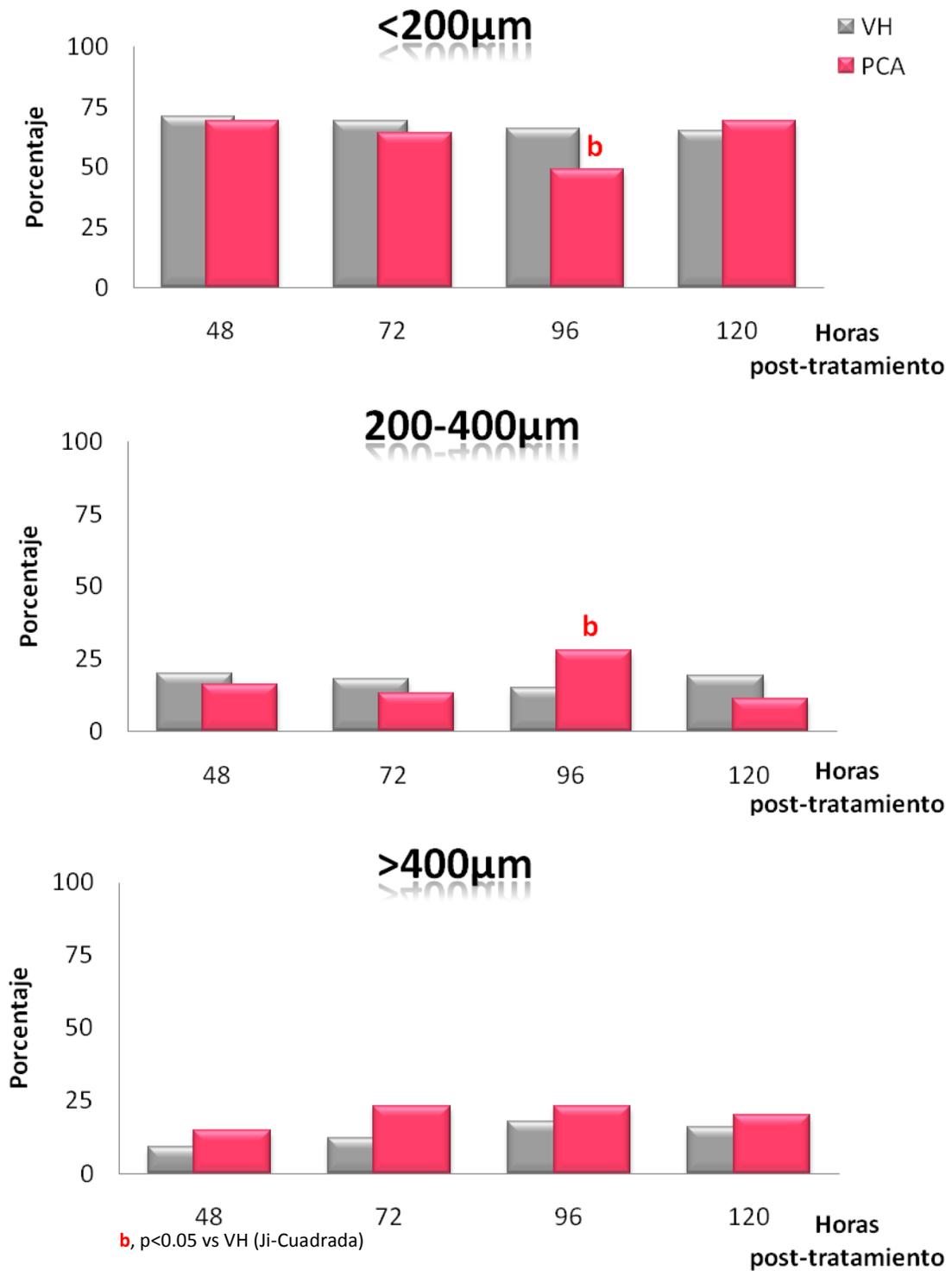


Figura 14: Porcentaje de folículos clase 1 (<200µm), clase 2 (200-400µm) y clase 3 (>400µm) en los ovarios izquierdos de ratas hembras con inyección de solución salina (VH) o con 0.1mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 y 120 horas después del tratamiento.

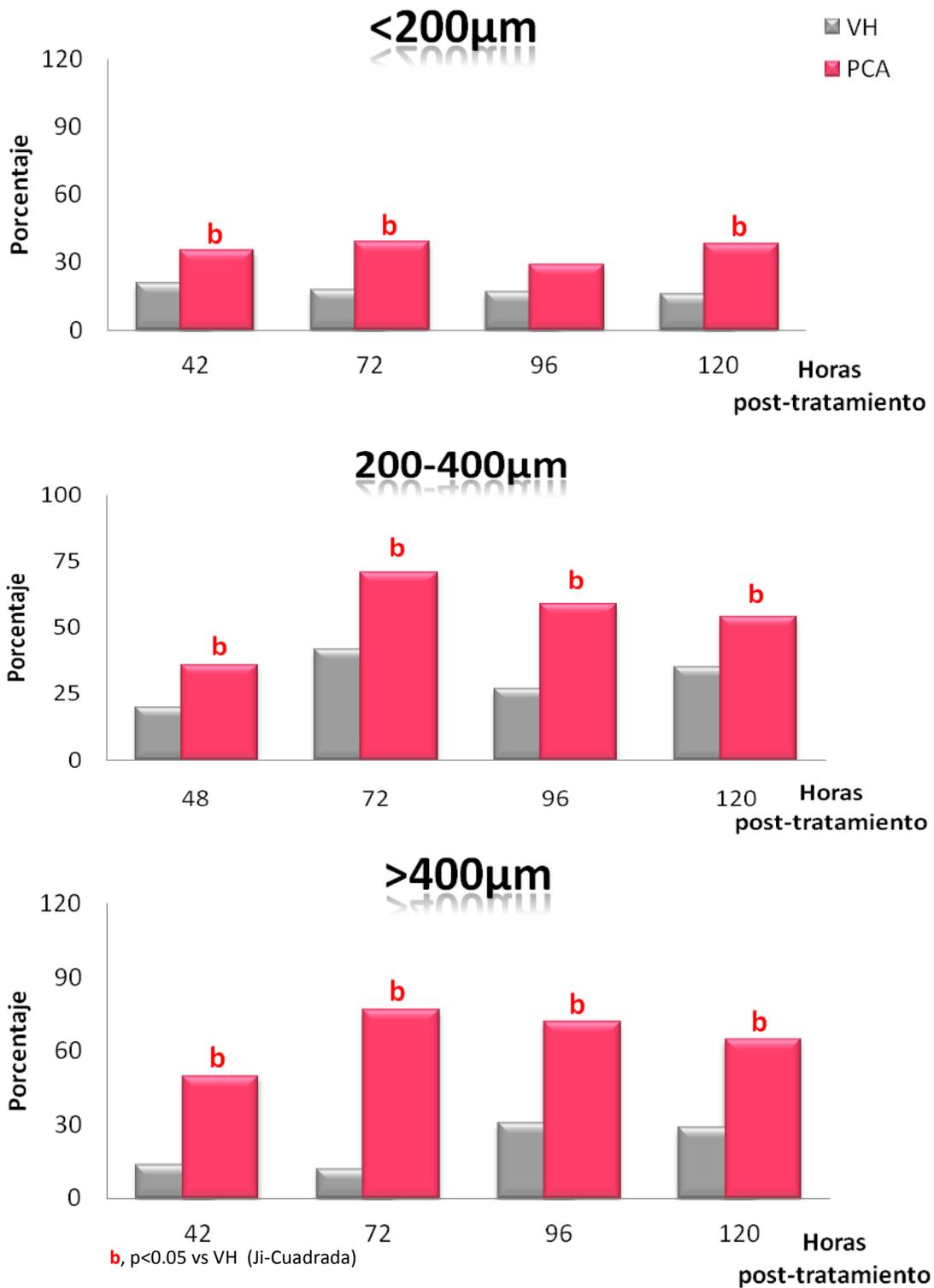


Figura 15: Porcentaje de folículos atrésicos clase 1 (<200µm), clase 2 (200-400µm) y clase 3 (>400µm) en los ovarios izquierdos de ratas hembras con inyección de solución salina (VH) o con 0.1 mg/ovario de PCA y sacrificadas a las 48, 72, 96 y 120 horas después del tratamiento.

- *Atresia folicular.*

Al realizar el análisis de atresia folicular en el ovario izquierdo de los animales de los diferentes grupos experimentales se consideraron cuatro características de atresia folicular: Engrosamiento de la teca, picnosis de las células de la granulosa, alteraciones del ovocito y descamación de células de la granulosa en el antro folicular. Por lo tanto en las figuras 16, 17, 18 y 19 se presenta el porcentaje de folículos que presenta alguna de las características de atresia arriba mencionadas, así como aquellos folículos que presentaban dos características de atresia.

En comparación con su grupo con VH, en los animales que se les administró la PCA y sacrificados a las 48 horas después del tratamiento no se observaron cambios significativos en el porcentaje de folículos que presentaron cada una de las características de atresia en comparación con el grupo que se les administró el VH (Figura 16).

En los animales que se les inyectó la PCA y sacrificados a las 72 horas, se observó el aumento significativo en el porcentaje de folículos que presentaron dos criterios de atresia (engrosamiento de la teca y descamación de células de la granulosa) en comparación con el grupo de animales que se les administró el VH (Figura 17).

En los animales tratados con PCA y sacrificados a las 96 horas post-tratamiento se observa la disminución significativa en los folículos con engrosamiento de la teca y aumento en los que presentan descamación de células de la granulosa, (Figura 18).

Por último los animales tratados con PCA y sacrificados a las 120 horas, muestran aumento significativo de picnosis en comparación con su respectivo grupo VH (Figura 19).

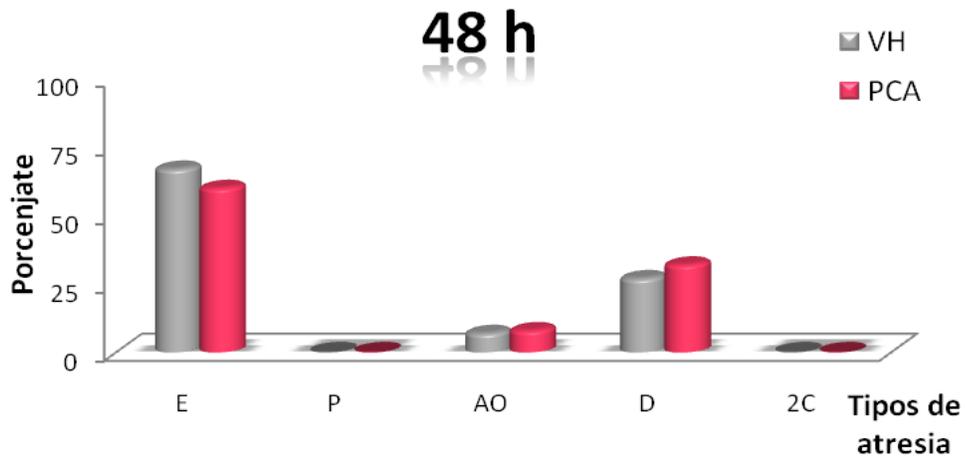


Figura 16. Porcentaje de folículos que presentan alguno de los criterios de atresia (E: engrosamiento de la teca, P: picnosis, AO: alteraciones del ovocito, D: descamación de células de la granulosa y 2C: dos características) en el ovario izquierdo de ratas hembra con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario o con 0.1 mg/ ovario de PCA y sacrificadas a las 48 horas después del tratamiento.

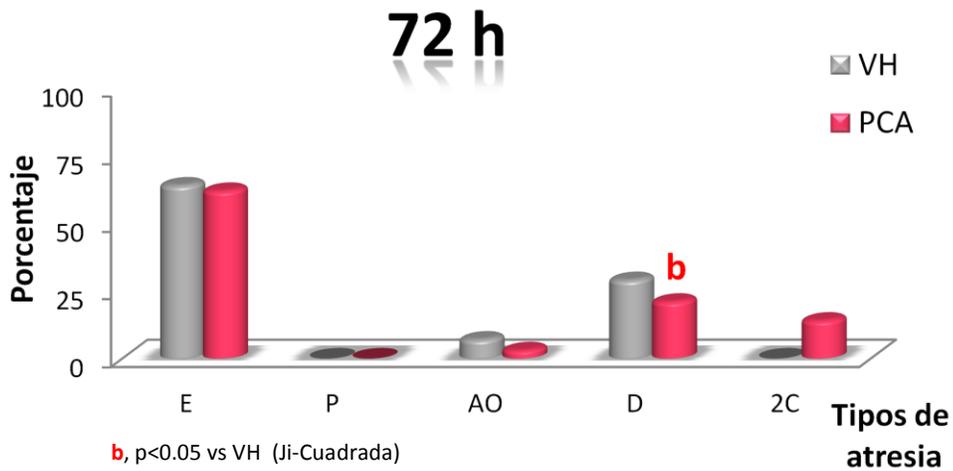


Figura 17. Porcentaje de folículos que presentan alguno de los criterios de atresia (E: engrosamiento de la teca, P: picnosis, AO: alteraciones del ovocito, D: descamación de células de la granulosa y 2C: dos características) en el ovario izquierdo de ratas hembra con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario o con 0.1 mg/ ovario de PCA y sacrificadas a las 72 horas después del tratamiento.

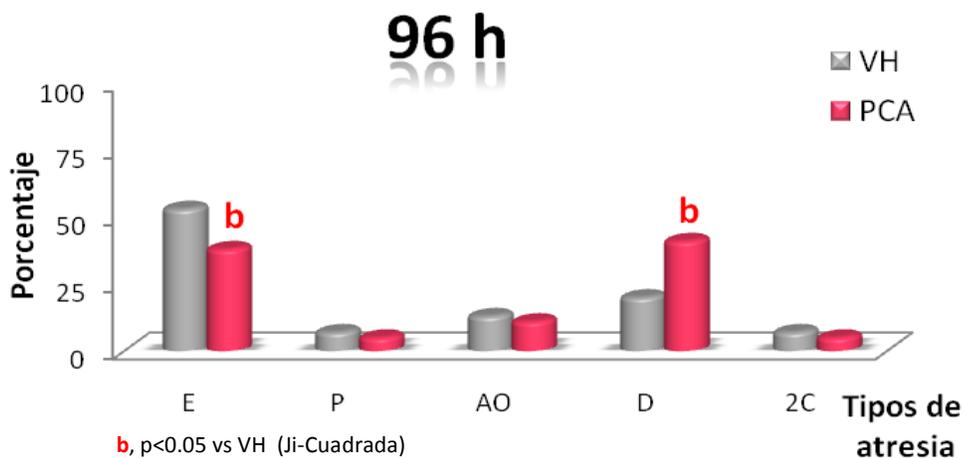


Figura 18. Porcentaje de folículos que presentan alguno de los criterios de atresia (E: engrosamiento de la teca, P: picnosis, AO: alteraciones del ovocito, D: descamación de células de la granulosa y 2C: dos características) en el ovario izquierdo de ratas hembra con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario o con 0.1 mg/ ovario de PCA y sacrificadas a las 96 horas después del tratamiento.

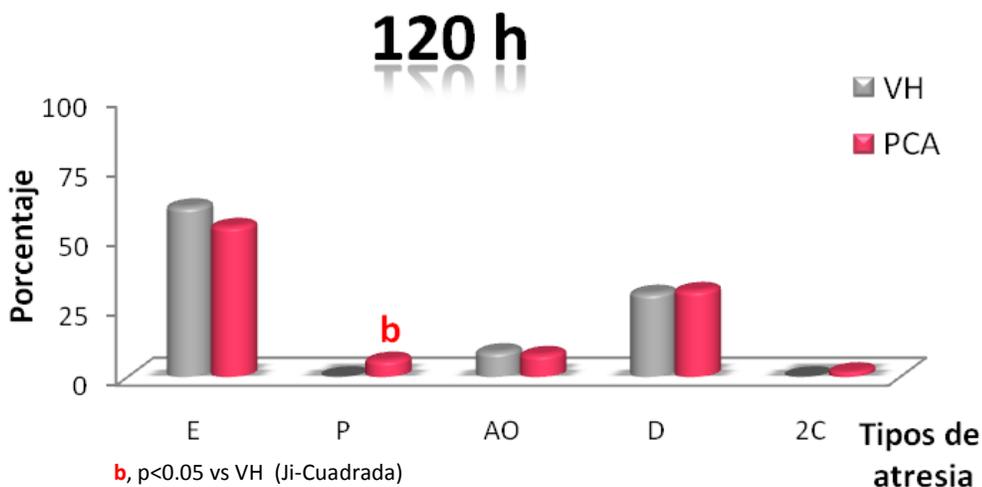


Figura 19. Porcentaje de folículos que presentan alguno de los criterios de atresia (E: engrosamiento de la teca, P: picnosis, AO: alteraciones del ovocito, D: descamación de células de la granulosa y 2C: dos características) en el ovario izquierdo de ratas hembra con inyección de solución salina (VH) en bursa del ovario o con 0.1 mg/ ovario de PCA y sacrificadas a las 120 horas después del tratamiento.

DISCUSIÓN

Los resultados del presente estudio muestran que la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la producción de estradiol, varía con la edad del animal.

La disminución en la concentración de estradiol en el suero de los animales a los que se les inyectó el VH en la bursa del ovario, posiblemente es el resultado de la modificación de la inervación que llega al ovario. Durante la cirugía se exterioriza el ovario con la finalidad de identificar la bursa y posteriormente se realiza la inyección del VH, por ello es posible que tal manipulación afectó al nervio ovárico superior (NOS), una de las principales fuentes de inervación simpática del ovario (Lawrence y Burden, 1980; Hill, 1962). Las terminales del NOS liberan en el ovario noradrenalina (NA) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), neurotransmisores considerados como reguladores de la esteroidogénesis (Dissen y Ojeda, 1999), debido a que facilitan la respuesta esteroidogénica de las células del folículo ovárico a las gonadotropinas y activan complejos enzimáticos implicados en la esteroidogénesis (Aguado y Ojeda, 1984; George y Ojeda, 1987), como la aromatasas (Dissen y Ojeda, 1999).

Otra posibilidad es que durante la cirugía para realizar la inyección del VH en la bursa del ovario se modificara la inervación que llega al ovario por el plexo nervioso ovárico (PNO), que viaja a lo largo de la arteria ovárica y que es fuente de noradrenalina, neuropéptido Y (NPY), sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Baljet y Drukker, 1980). Sin embargo, se plantea que las fibras que transportan SP y CGRP, no están implicadas en la regulación de la esteroidogénesis en la gónada, pero sí en la modulación del flujo sanguíneo (Calka y col., 1988; Dees y col., 1986;). Por ello, no se descarta la posibilidad de que en los animales tratados con VH se modificara la disponibilidad de FSH y de esta forma la aromatización de la testosterona en estradiol. El hecho de que el número de folículos no se modificó aún cuando se plantea el posible cambio en la disponibilidad de FSH, se puede atribuir a que el crecimiento folicular también depende de otras hormonas, como los estrógenos y LH, por factores de crecimiento entre los que se encuentra el Factor de Crecimiento de Fibroblasto-7 (FGF-7) que estimula el crecimiento de los folículos preantrales; el Factor de Crecimiento y diferenciación 9 (GDF-9), producido por los ovocitos

en crecimiento y necesario para la transición de los folículos primarios a secundarios; el Factor de Crecimiento parecido a la Insulina (IGF-I) que es necesario para el desarrollo de los folículos secundarios y antrales (Dong y col., 1996; Irusta, 2008).

El incremento en la concentración de serotonina observada en los animales tratados con VH en comparación con el grupo testigo posiblemente se deba a la liberación de serotonina por la fuente exógena del ovario, las plaquetas y mastocitos (Marathias y col., 1991; Ringvall y col., 2008; Sirotkin-Schaeffer, 1997); como respuesta al estímulo de tipo inflamatorio generado por la cirugía y la manipulación del ovario. En apoyo a esta idea se plantea que la inflamación es una respuesta protectora con la finalidad de restaurar los tejidos lesionados, que en nuestro estudio es el tejido que constituye la bursa del ovario. Además en una reacción inflamatoria se activan los mastocitos y las plaquetas que secretan serotonina, con la finalidad de producir vasodilatación y aumentar la permeabilidad vascular (Vallés y col., 2012).

La disminución en la concentración de serotonina observada en los animales sacrificados a las 48 horas posteriores al tratamiento con PCA, posiblemente es el resultado de la inhibición de la actividad de la enzima TPH isoforma 1, en relación a esto se ha mostrado que en las células de la granulosa que rodean al ovocito se expresa esta enzima (Dubé y Amireault, 2007). Es posible que la disminución en la concentración de serotonina no se mantuvo a las 72, 96 y 120 horas posteriores a la administración de la PCA, debido a que se ha demostrado que la isoforma 1 de la TPH es más resistente a la acción de las anfetaminas (Zhang, 2004).

Otra posible explicación a la falta de cambios en la concentración de serotonina en el ovario de los animales tratados con la p-Cloroanfetamina y sacrificados a las 72, 96 y 120 horas sea el resultado de un mecanismo compensador y que en estos periodos la fuente exógena de serotonina en el ovario, las plaquetas y los mastocitos (Marathias y col., 1991; Ringvall y col.; Sirotkin-Schaeffer, 1997), fueron los que liberaron la serotonina como respuesta a estímulos de tipo inflamatorio. Otra posible explicación es que la cuantificación de la amina se realizó en todo el ovario y se ha reportado que la serotonina se produce sólo en células de la

granulosa, específicamente en las células que conforman el cumulus ooforus (Dubé y Amireault, 2007).

La concentración de 5-HIAA presentó un aumento significativo a las 48 y 96 horas posteriores al tratamiento. Aún cuando no hay información que muestre que en el ovario, la actividad de la MAO es diferente a la que se presenta en el sistema nervioso central, no se puede descartar la posibilidad de que la isoforma de la MAO presente en el ovario no sea blanco de la acción de la PCA, y por consiguiente su capacidad para degradar la serotonina no se vea afectada. Esto se apoya en el hecho de que la isoforma de la enzima que participa en la síntesis de serotonina, la TPH₁ y que se encuentra en el ovario es menos susceptible a la acción de las anfetaminas que la isoforma TPH₂ que se localiza en el sistema nervioso central (Zhang, 2004).

La disminución en la concentración de estradiol en todos los periodos estudiados, en el suero de los animales a los que se les administró la anfetamina, nos lleva a pensar que esto es el resultado de que se modificó al sistema serotoninérgico del ovario. La serotonina posiblemente actuó como un regulador autócrino. La posibilidad de que la serotonina actúa de forma autócrina modulando la aromatización de los andrógenos a estrógenos, se apoya en las evidencias que muestran que en el ratón, las células de la granulosa que rodean al ovocito expresan los receptores a serotonina 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT₇ (Dubé y Amireault, 2007), por lo que es posible que la serotonina al unirse a sus receptores presentes en las células de la granulosa, desencadene una cascada de señalización, que disminuye la acción de la FSH en las células de la granulosa y como consecuencia ejerce un papel inhibitorio en la modulación de la actividad de la enzima aromatasa, responsable de la conversión de andrógenos a estrógenos (Cui y col., 2013). Aunado a esto, se ha mostrado que cuando a ratas hembra de 30 días, se les administra serotonina directamente en la bursa del ovario, la concentración de estradiol en suero disminuye (Morán y col., 2012).

El hecho de que en los animales que se les administró PCA y sacrificados a los 48 horas la disminución en la concentración de serotonina en el ovario se acompañara de la menor concentración de estradiol, permite plantear que la serotonina ejerce un efecto estimulante

en la secreción de estradiol. Mientras que, a las 72, 96 y 120 horas la recuperación de la concentración de serotonina en el ovario se acompañó de la disminución de estradiol, lo que indicaría que la serotonina ejerce un efecto inhibitorio. No se tiene una explicación a esto, sin embargo es posible que el papel que ejerce la serotonina en la modulación de la síntesis de estradiol por el ovario varíe a lo largo del desarrollo del animal prepúber. Esta participación diferencial de la serotonina se ha mostrado en la secreción de gonadotropinas (Arias y col., 1990).

Aún cuando se desconoce el mecanismo, es posible que la PCA además de actuar en el sistema serotoninérgico del ovario, modificara la inervación noradrenérgica que recibe el ovario, esta idea se apoya en el hecho de que cuando se administra la PCA en la bursa del ovario se incrementa la concentración del MHPG, principal metabolito de la NA, lo que se reflejó en la disminución en la secreción de estradiol en estos animales. En el Sistema Nervioso Central se ha mostrado que cuando el metabolito de un neurotransmisor aumenta, es un indicador de que ese sistema de neurotransmisión es muy activo (Shannon y col., 1986). La posibilidad de que en la rata hembra adulta (Kagitani y col., 2008) y prepúber (Aguado y Ojeda, 1984), la inervación que transcurre por el NOS participa en la modulación de la secreción de estradiol, ya ha sido planteada previamente. Cuando en la rata hembra adulta se realiza la estimulación eléctrica del NOS, disminuye significativamente la secreción de estradiol por el ovario (Kagitani y col., 2008). Estos resultados llevaron a los autores a concluir que el NOS participa de forma inhibitoria en la síntesis de estradiol en el ovario.

Otro factor que posiblemente contribuyó a la disminución en la concentración de estradiol en el suero de los animales que se les administró la PCA en bursa del ovario es el resultado de la disminución en la síntesis de DA, debido a que en la gónada de los animales tratados con la PCA, la concentración de DA disminuyó a valores por debajo de la sensibilidad del método. Con base en esto, es posible proponer que en el ovario de estos animales se modificó la actividad de las fibras que inervan al ovario, particularmente las que transcurren por el NOS. Esta idea se sustenta en las evidencias reportadas por Bronzi y colaboradores (2011), quienes mostraron que cuando se activa el ganglio celíaco, se modifica la actividad del NOS y esto se acompaña del incremento en la concentración de DA en el ovario, hecho

que apoya la idea de que el NOS es una de las fuentes de DA de la gónada. Aunado a esto, se ha demostrado que la DA estimula la producción de estradiol en cultivo de células de la granulosa del ovario de mujer (Bódis y col., 1993). Estas evidencias coinciden con lo observado en el presente estudio, debido a que en los animales tratados con PCA, la baja concentración de DA en el ovario se acompañó de la disminución en la concentración de estradiol en suero.

Con estas evidencias es posible sugerir que el activar los sistemas de neurotransmisión de NA y DA este inhibiendo localmente la esteroidogénesis como otra explicación a la disminución de la concentración de estradiol.

No se puede descartar la posibilidad de que los cambios que se observaron en el sistema noradrenérgico y dopaminérgico del ovario de los animales a los que se les administró la PCA se relacionen con modificaciones en la inervación intrínseca del ovario. Tal inervación se ha identificado en el mono Rhesus y en la rata Wistar (D'Albora y Barcia, 1996; Dees y col., 1995), sin embargo no hay reportes que muestren la presencia de esta inervación en el ovario de rata Long Evans (D'Albora y col., 2000).

El incremento en el porcentaje de folículos atrésicos en los ovarios de los animales que se les administró la anfetamina en la bursa del ovario, posiblemente se relacione con la disminución en la concentración de estradiol. Este esteroide junto con las gonadotropinas, estimulan la proliferación celular y favorecen el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. En ratones knockout que no expresan el gen CYP19 de la aromatasa, no transforman los andrógenos a estrógenos, por ello no se detectan estrógenos en suero, en el ovario no hay desarrollo de los folículos y son infértiles debido a la ausencia de ovulación (Britt y col., 2001). Así mismo, en ratones knockout que no expresan el receptor a los estrógenos β no hay desarrollo folicular y esto conduce a la infertilidad, mientras que en los animales que no se expresa el α , presentan desarrollo folicular (Emmen y col., 2005). Estos resultados llevaron a los autores a mostrar que el estradiol al unirse a sus receptores β es un factor importante que favorece el desarrollo del folículo ovárico. Además de estimular el crecimiento del folículo por sus propiedades mitogénicas, este esteroide es considerado un

factor de sobrevivencia de las células de la granulosa. Lee y colaboradores (2013) mostraron que cuando en ratas hembras adultas disminuye la enzima aromatasa y la producción de estradiol debido a la administración de Bisfenol A, se incrementa la atresia folicular.

Conjuntamente con nuestros resultados y los de bibliografía antes mencionados, nos permite plantear la idea de que la disminución en la concentración de estradiol en el suero de los animales que se les inyectó la PCA en la bursa del ovario, es un factor que influyó en que se modificara el desarrollo del folículo, debido a que un mayor número de estos se fueron a la atresia.

CONCLUSIONES

- La PCA modifica el sistema serotoninérgico del ovario de la rata hembra prepúber.
- La PCA en el ovario incrementa la concentración del metabolito de la noradrenalina, el MHPG, lo cual es un indicador de aumento de la actividad de las fibras noradrenérgicas.
- La PCA en el ovario disminuye la síntesis de dopamina y aumenta su metabolismo.
- La modificación del sistema serotoninérgico del ovario inducido por la administración de la PCA disminuye la concentración de estradiol.
- La participación del sistema serotoninérgico del ovario en la regulación de la producción de estradiol, varía con la edad del animal.
- La disminución en la concentración de estradiol favorece la atresia folicular.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguado LI, Ojeda SR. (1984). Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology*, 114: 1944-1946.
- Arce VM, Catalina PF, Mallo F. (2006). *Endocrinología*. Universidad de Vigo. España. pp. 95-100.
- Arias P, Szwarcfarb B, Rondina D, Carbone S, Sverdlik, Moguilevsky J. (1990). In vivo and in vitro studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in prepuberal and peripuberal female rats. *Brain Research*, 523: 57-61.
- Ayala ME, Rosas P, Domínguez R. (1993). Effects of serotonergic blockade provoked at different ages on spontaneous and induced puberty in the female rat. *Medical Science Research*, 21: 509-511.
- Baljet B, Drukker J. (1980). The extrinsic innervations of the pelvic organs in the female rat. *Acta Anatomica*, 107:241-67.
- Battista PJ, Condon WA. (1986). Serotonin-induced stimulation of progesterone production by cow luteal cells in vitro. *Journal of Reproduction and Fertility*, 76:231-238.
- Berger UV, Grazanna R, Molliver ME. (1990). Unlike systemic administration of PCA, direct intracerebral injection does not cause neurotoxicity on 5-HT axons. *Exp. Neurol.* 109: 257-268.
- Benningfield MM, Cowan RL. (2013). Brain serotonin function in MDMA (ecstasy) users: evidence for persisting neurotoxicity. *Neuropsychopharmacology*, 38: 253-255.

-
- Bódis J, Tinneberg HR, Török A, Cledon P, Hanf V, Papenfuss F. (1993). Effect of noradrenaline and dopamine on progesterone and estradiol secretion of human granulosa cells. *Acta Endocrinologica*, 129: 165-8.
 - Bódis J, Török A, Tinneberg HR, Hanf V, Harmori M, Cledon P. (1992). Influence of serotonin on progesterone and estradiol secretion of cultured human granulosa cells. *Fertility and Sterility*, 57: 1008-1011.
 - Boron W, Boulpaep E. (2012). *Medical Physiology*. Elsevier. 2nd edition. Versión eBook.
 - Botella J. (1995). *El Ovario: Fisiología y patología*. Ediciones Díaz de Santos SA. España. pp. 11-12, 130-136.
 - Brailowsky S. (2002). *Las sustancias de los sueños*. 3ª ed. Editorial Fondo de Cultura Económica. México. 254-256.
 - Britt KL, Drummond AE, Dyson M, Jones ME, Simpson ER, Findlay JK. (2001). The ovarian phenotype of the aromatase knockout (ArKO) mouse. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 79: 181-5.
 - Bronzi D, Vega A, Delgado SM, Casais M, Rastrilla AM, Sosa Z. (2011). Modulation of the noradrenergic activity index by neural stimulus, and its participation in ovarian androstenedione release during the luteal phase. *Fertility and Sterility*, 95: 1211-6.
 - Calka J, McDonald JK, Ojeda SR. (1988). The innervations of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biology of Reproduction*, 39: 1215-23.
 - Callado LF. (2001). *Neurobiología de la drogadicción II. Cocaína y drogas de diseño*. *Osasunaz*, 4: 197-210.
 - Clausell DE, y Soliman FA. (1978). Ovarian serotonin content in relation to ovulation. *Experientia* 34: 410-411.

-
- Colado MI, Green AR. (1994). A study of the mechanism of MDMA ('Ecstasy')-induced neurotoxicity of 5-HT neurones using chlormethiazole, dizocilpine and other protective compounds. *Br. J Pharmacol.* 111: 131-136
 - Constanzo, L. (2000). *Fisiología*. Editorial McGraw-Hill Interamericana. España. pp. 430.
 - Cui J, Shen Y, Li R. (2013). Estrogen synthesis and signaling pathways during ageing: from periphery to brain. *Trends in Molecular Medicine.* 19:197-209.
 - Cortés OD. (2009). Efecto de la Administración de 5-Hidroxitriptófano en la secreción de progesterona y estradiol en la rata prepúber. Tesis de Licenciatura, FES Zaragoza UNAM, pp.62.
 - D'Albora H, Barcia JJ (1996). Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neuroscience Letters*, 205: 65-67.
 - D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell and tissue Research*, 300: 47-56.
 - Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR. (1986). Substance P-and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology*, 119: 638-41.
 - Dees WL, Hiney JK, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR. (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology*, 136: 5760-5768.
 - Dissen GA, Ojeda SR. (1999). Ovarian innervations. p. 583-589. In Knobil E. and Neil JD. (eds.). *Encyclopedia of Reproduction*. Vol.3. Academy Press, USA.
 - Domínguez R, Chávez R, Cruz ME. (1991). *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Miguel Ángel Porrúa. México. p. 161-192.

-
- Dong J, Albertini DF, Nishimori K, Kumar TR, Lu N, Matzuk MM. (1996). Growth differentiation factor-9 is required during early ovarian folliculogenesis. *Nature*, 383: 531- 535.
 - Dubé, F, Amireault, P. (2007). Local serotonergic signaling in mammalian follicles, oocytes and early embryos (review). Elsevier, *Life Sciences*. 81, 1627-1637.
 - Edson M, Nagaraja AK, Matzuk MM. (2009). The mammalian ovary from genesis to revelation. *Endocrine reviews*, 30:624-712.
 - Emmen JM, Couse JF, Elmore SA, Yates MM, Kissling GE, Korach KS. (2005). In vitro growth and ovulation of follicles from ovaries of estrogen receptor (ER) (alpha) and ER (beta) null mice indicate a role for ER (beta) in follicular maturation. *Endocrinology*, 146: 2817-26.
 - Filicori M. (1999). The role of luteinizing hormone in folliculogenesis and ovulation induction. *Fertility and Sterility*, 71: 405-414.
 - Franco JP, Ballesteros PZ, Custodio V, Paz C. (2012). Principales neurotransmisores involucrados en la regulación del sueño-vigilia. *Revista de Investigación Clínica*, 64: 182-191.
 - George FW, Ojeda SR. (1987). Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America*, 84: 5803-5807.
 - Gershon MD. (2013). 5-Hydroxytryptamine (serotonin) in the gastrointestinal tract. *Current Opinion in Endocrinology, Diabetes and Obesity*, 20: 14-21.
 - Gómez-Chang, E., Larrea, F. Martínez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *TIP Revista especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 15:24-26.

-
- Gore-Langton RE, Armstrong DT (1994). Follicular Steroidogenesis and its control. En: The Physiology of Reproduction. E. Knobil y JD Neil (Eds). 2^a ed. Ed. Raven Press. New York. pp. 571-611.
 - Gougeon A. (1996). Regulation of ovarian follicular development in primates: facts and hypotheses. *Endocrine Reviews*. 17:121-155.
 - Gouveia EM, Rodrigues C. (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.
 - Greenwald GS, Terranova PF, (1988). Follicular Selection and its Control En: The Physiology of Reproduction. E. Knobil y JD Neill (Eds.). 2^a ed. Raven Press, New York. pp. 387-445.
 - Havelock JC, Rainey WE, Carr BR. (2004). Ovarian granulosa cell lines. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 228: 67-78.
 - Hu J, Zhang Z, Shen WJ, Azhar S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition & Metabolism*, 7:47.
 - Hyman SE. (1996). Addiction to Cocaine and Amphetamine. *Neuroscience*, 16:901-904.
 - Irusta G. (2008). Mecanismos involucrados en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. Tesis Doctoral. Universidad de Buenos Aires. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. pp. 180.
 - Justo, SN, Rossano GL, Szwarcfarb, B, Rubio, MC, Moguilevsky JA. (1989). Effect of Serotonergic System on FSH Secretion in Male and Female Rats: Evidence for Stimulatory and Inhibitory Actions. *Neuroendocrinology*, 50:382-386.

-
- 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 rate in rats. *The Journal of Physiological Sciences*, 58: 133-138.
 - Lawrence IE Jr, Burden HW. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*. 191:51-59.
 - Lee SG, Kim JY, Chung JY, Kim YJ, Park JE, Oh S, Yoon YD, Yoo KS, Kim JM. (2013). Bisphenol A exposure during adulthood causes augmentation of follicular atresia and luteal regression by decreasing 17 β -Estradiol synthesis via downregulation of aromatase in rat ovary. *Environmental Health Perspectives*. 121: 663-669.
 - Leung P, Adashi, EY. (2004). *The Ovary*. 2nd ed. Editorial Elsevier Academic Press. USA.
 - Li M, Zhou TH, Gao Y, Zhang N, Li JC. Ultrastructure and Estrogen Regulation of the Lymphatic Stomata of Ovarian Bursa in Mice. *The Anatomical Record*, 290:1195-1202.
 - Linder AE, Ni W, Díaz JL, Szasz T, Burnett R, Watts SW. (2007). Serotonin (5-HT) in veins: Not all in vain. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 343: 415-421.
 - 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.
 - Lorenzo P, Moreno A, Tizesoain I, Leza JE, Mora MA, Portolés A. (2008). *Farmacología básica y clínica*. España. 18^a ed. Médica Panamericana. pp.189-190.
 - Lundy T, Smith P, O'Connell A, Hudson NL, McNatty KP. (1999). Populations of granulose cells in small follicles of the sheep ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*, 115: 251-262.

-
- Lüllman H, Mohr K, Hein L. (2010). *Farmacología: Texto y Atlas*. España. 6ª ed. Médica Panamericana. pp. 116-117.
 - Marathias K, Lambracht-Hall M, Savala J, Theoharides TC. (1991). Endogenous regulation of rat brain mast cells serotonin release. *International Archives of Allergy and Applied Immunology*. 95: 332-340.
 - Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME, Ojeda SR. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: Induction of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, 138:3320-3329.
 - Mayerhofer A, Smith GD, Danilchick M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR. (1998). Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95: 10990-10995.
 - Molist P, Pombal M, Megías M. (2011). *Atlas de Histología Vegetal y Animal*. Facultad de Biología, Universidad de Vigo, España. Versión Online.
 - Morán MJ, Ayala ME, Gallegos E, Romero J, Chavira R, Damián-Matsumura P, Domínguez R. (2012). Effects of systemic or intrabursal injection of serotonin on puberty, first ovulation and follicular development in the rat. *Reproduction Fertility and Development*, 25:1105-14.
 - Muñoz H, Vargas A. (2004). Síndrome serotoninérgico. *MED UNAB*, 7:20; 144-150.
 - Murlane KS, Perrine SA, Finton BJ, Galloway MP, Howell LL, Fantegrossi WE. (2012). Effects of exposure to amphetamine derivatives on passive avoidance performance and the central levels of monoamines and their metabolites in mice: correlations between behavior and neurochemistry. *Psychopharmacology*, 220: 495-508.
 - Puelles L, Martínez S, Martínez M. (2008). *Neuroanatomía*. España. Editorial panamericana. pp. 1-9.

-
- Ramamoorthy S, Blakely RD. (1999). Phosphorylation and Sequestration of Serotonin Transporters Differentially Modulated by Psychostimulants. *Science*, 286:763-766.
 - Rang H, Dale M, Ritter J, Moore P. (2004). *Farmacología*. 5ª ed. Editorial Elsevier. España. pp. 184-186.
 - Ringvall M, Ronnberg E, Wernersson S, Duelli A, Henningsson F, Abrink M, Garcia-Faroldi G, Fajardo I, Pejler G. (2008). Serotonin and histamine storage in mast cell secretory granules is dependent on serglycin proteoglycan. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 121:1020–1026.
 - Robledo P. (2008). Las anfetaminas. Revisión. *Trastornos Adictivos*, 10(3):166-174.
 - Rosales AM, Guzmán A. (2008). Apoptosis in follicular atresia and luteal regression. *Técnicas Pecuarias en México*. 46:159-182.
 - Salín-Pascual R. (2008). *Neurobioquímica y psicofarmacología de las enfermedades psiquiátricas*. México. UNAM. pp. 79-88.
 - Sanders-Bush E, Bushing JA, Sulser F. (1975). Long-term effects on p-chloroamphetamine and related drugs on central serotonergic mechanism. *192: 33-40*.
 - Schmidt G, Kannisto P, Owan C, Sjöberg NO. (1988). Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused *in vitro*? *Acta Physiologica Scandinavica*, 132: 251-256.
 - Sekerke HJ, Smith HE, Bushing JA, Sanders-Bush E. (1975). Correlation between brain levels and biochemical effects of the optical isomers of p-cloroamphetamine. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 193: 835-844.
 - Shannon NJ, Gunnet JW, Moore KE. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *Journal of neurochemistry*, 47: 958-965.

-
- Sirotkin-Schaeffer. (1997). Direct regulation of mammalian reproductive organs by serotonin and melatonin, *Journal of Endocrinology*. 152: 1-5.
 - Takagi K, Yamada T, Miki Y, Umegaki T, Nishimura M, Sasaki J. (2007). Histological Observation of the Development of Follicles and Follicular Atresia in Immature rat Ovaries. *Acta medica Okayama*, 61: 283-298.
 - Tanaka E, Baba N, Toshida K, Suzuki K. (1993). Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. *Life Sciences*, 53: 563-570.
 - Tresguerres JAF, et al. (2010). *Fisiología Humana*. 4ª ed. Editorial McGraw Hill. España. 1008-1022.
 - Utrilla P. (2000). Aspectos farmacológicos de las anfetaminas. *Ars Pharmaceutica*, 41:1; 67-77.
 - Uzumcu M, Zachow R. (2007). Developmental Exposure to Environmental Disruptors Consequences within the Ovary and on Female Reproductive Function. *Reproductive Toxicology*. 23: 337-352.
 - Vallés J, Moscardó A, Latorre A, Madrid I, Santos MT. (2012). Las plaquetas como nexo entre inflamación y trombosis. Centro de Investigación. Hospital Universitario y Politécnico La Fe Valencia. VII Curso de Trombosis y Homeostasia. p 1-17.
 - Vanderhyden BC, Rouleau A. Armstrong DT. (1986). Effect of removal of the ovarian bursa of the rat on infundibular retrieval and subsequent development of ovulated oocytes. *Journal of Reproduction and fertility*, 77: 393-399.
 - White SR, Obradovic T, Imel KM, Wheaton MJ. The effects of methylenedioxymethamphetamine (MDMA, "ecstasy") on monoaminergic neurotransmission in the central nervous system. (1996). *Progress in Neurobiology*, 49: 455-479.

-
- Yao HH, Bahr JM. (1999). Ovary, Overview, p. 590-605. In Knobil E and Neil JD (eds.) Encyclopedia of Reproduction Vol.3. Academy press. USA.
 - Young JM, McNeilly AS. (2010). Theca: the forgotten cell of the ovarian follicle. Reproduction, 140: 489-504.
 - Zhang X, Beaulieu JM, Sotnikova T, Gainetdinov R, Caron M. (2004). Tryptophan Hidroxilase-2 controls brain serotonin synthesis. Science, 309: 217.