

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



“Ciclo estral, concentración de estradiol y receptores a estrógenos alfa ($RE\alpha$) en útero y ovarios de la rata tratada neonatalmente con clomipramina (CMI)”

TESIS

**Que para obtener el grado de
Maestra en Biología de la Reproducción Animal**

P R E S E N T A

B.E. Yumara Lee Pérez Bautista

Comité tutorial

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Dra. Tania Molina Jiménez

Dr. César Soria Fregozo

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: “Ciclo estral, concentración de estradiol y receptores a estrógenos alfa (REα) en útero y ovarios de la rata tratada neonatalmente con clomipramina (CMI)”, que presentó la alumna: Yumara Lee Pérez Bautista, el día 06 de diciembre del año 2018.

Sinodales:

Dra. Tania Molina Jiménez

(Presidente)

Profesor

Facultad de Biología y Facultad de Q.F.B

Universidad Veracruzana.

Dr. César Soria Fregozo

(Secretario)

Profesor Investigador

Departamento de Ciencias de la Tierra y de la Vida.

Centro Universitario de los Lagos,

Universidad de Guadalajara.

Dra. Albertina Cortés Sol

(Vocal)

Profesor Investigador

Departamento de Biología y Ecología del

Comportamiento.

Facultad de Biología Región Xalapa,

Universidad Veracruzana.

Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

(Vocal)

Profesor Investigador

Departamento de Biología de la Reproducción,

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

Comité tutorial

Directora

Dra. Herlinda Bonilla Jaime

Profesor-Investigador Titular C

Departamento de Biología de la Reproducción
Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa

Asesores

Dra. Tania Molina Jiménez

Profesor

Facultad de Biología y Facultad de Q.F.B
Universidad Veracruzana.

Dr. César Soria Fregozo

Profesor Investigador

Departamento de Ciencias de la Tierra y de la Vida
Centro Universitario de los Lagos, Universidad de Guadalajara

Dedicatorias

A MIS PADRES

Por el apoyo que me brindaron, sus buenas enseñanzas y sus buenos ejemplos que me han inculcaron desde pequeña he llegado hasta aquí. Por enseñarme que todo lo que se empieza se tiene que terminar y que la humildad vale más que todo el oro en el mundo. Los amo infinitamente!!!

A MIS HERMANOS

Por formar parte de mi vida, por estar unidos siempre, por regalarme tantas alegrías a lo largo de mi vida, por todos esos recuerdos tan lindos de mi infancia. Are y Mey, gracias por darme el mejor regalo que un hermano puede dar: a mis príncipes hermosos y a mi princesita linda.

A MIS PRÍNCIPES Y PRINCESA

Por enseñarme que el amor incondicional existe, por llenar mi vida de alegría, aun en los peores momentos y por sacar lo mejor de mí como persona.

A JUAN MANUEL

Por ese amor y cariño incondicional que siempre me has demostrado, por estar con migo compartiendo mis alegrías, pero también, por estar en esos momentos que han sido difíciles, por motivarme a seguir siempre adelante y nunca me dejarme caer, por hacer de mí una mejor persona y por llenarme de momentos felices. Te amo!!!

Agradecimientos

A MIS TUTORES

Dra. Herlinda Bonilla Jaime, por compartir sus conocimientos con migo, por brindarme de su tiempo para resolver mis dudas, por todos sus comentarios que me han ayudado a mejorar y por todo el apoyo que me ha brindado, le agradezco infinitamente.

Dr. César Soria Fregozo, por compartir de sus conocimientos con migo, por dedicar de su tiempo para revisar mi tesis, por hacer el esfuerzo trasladarse de Lagos de Moreno a la Ciudad de México para asistir a mis exámenes tutorales, por todos sus comentarios y sugerencias que me han ayudado a mejorar, muchas gracias Doc.

Dra. Tania Molina Jiménez, por compartir de sus conocimientos con migo, por dedicar de su tiempo para revisar mi tesis, por ser exigente con migo, por sus comentarios y sugerencias, lo cual me ha ayudado a mejorar, por hacer el esfuerzo de trasladarse desde Jalapa a la Ciudad de México para asistir a mis exámenes tutorales, gracias Dra.

A MIS SINODALES

Dra. Albertina Cortés Sol y Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos, por dedicar de su tiempo para revisar mi tesis, por sus comentarios que ayudaron a mejorar este trabajo y por estar presentes el día de mi examen.

A MIS AMIGOS

Kari, Maribel, Angie, Pablito, Joelito, por brindarme su amistad y escucharme cuando los necesito, por compartir lindos momentos y brindarme de su ayuda cuando la he requerido.

A CONACYT

Por apoyarme brindándome una beca para poder realizar mi maestría. (Becario 621487).

ÍNDICE

RESUMEN.....	9
INTRODUCCIÓN.....	10
1.- ANTIDEPRESIVOS DURANTE EL EMBARAZO.....	11
1.1.- SEROTONINA.....	13
1.2.- SEROTONINA Y NEURODESARROLLO.....	14
1.3.- FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS Y NEURODESARROLLO.....	16
1.4.- EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO.....	19
1.5.- ESTRÓGENOS.....	21
1.5.1.- RECEPTORES A ESTRÓGENOS.....	22
1.6.- CICLO ESTRAL.....	24
1.7.- SEROTONINA Y CICLO ESTRAL.....	26
1.8.- TRATAMIENTO NEONATAL CON CMI.....	28
1.9.- ANTECEDENTES.....	30
2.- JUSTIFICACIÓN.....	31
2.1.-PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN.....	33
2.2.-HIPÓTESIS.....	33
2.3.- OBJETIVO GENERAL.....	33
2.4.- OBJETIVOS PARTICULARES.....	33
2.5.- MATERIAL Y MÉTODO.....	34
2.6.- SUJETOS EXPERIMENTALES.....	34
2.7.- TRATAMIENTO NEONATAL CON CMI.....	34
2.8.- CICLO ESTRAL.....	35
2.9.- CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL.....	36
3.- EXPRESIÓN DE RE α	36
3.1.- ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	39
3.2.-RESULTADOS.....	40
3.3.- DISCUSIÓN.....	46
3.4.- CONCLUSIÓN.....	53
3.5.-BIBLIOGRAFÍA.....	54

Abreviaturas

5-HT	5-hidroxitriptamina, serotonina
ADN	Acido desoxirribonucleico
APO	Área preóptica
ARN	Ácido ribonucleico
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementario
CMI	Clomipramina
CSM	Conducta sexual masculina
CTRL	Control tratado neonatalmente con solución salina
FSH	Hormona folículo estimulante
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
HHA	Hipotálamo hipófisis adrenal
HHG	Hipotálamo hipófisis gónada
HHO	Hipotálamo hipófisis ovario
HVM	Hipotálamo ventromedial
ISRS	Inhibidores selectivos de la recaptura de serotonina
LH	Hormona luteinizante
MAO	Monoaminoxidasa
M-D	Metaestro-diestro
NA	Noradrenalina
NA	Núcleo arcuato
NCL	Núcleo caudal lineal
NLM	Núcleo lemniscus
NPOm	Núcleo preóptico medial
NRD	Núcleo del rafe dorsal
NRI	Núcleo reticular intermedio
NRM	Núcleo del rafe medial
NRMa	Núcleo del rafe magnus
NRO	Núcleo del rafe obscurus
NRP	Núcleo del rafe pallidus
NVLM	Núcleo central lateral medular

P-E	Proestro-estro
RE	Receptores a estrógenos
RE α	Receptores a estrógenos α
RE β	Receptores a estrógenos β
RIA	Radioinmunoanálisis
SERT	Transportador de serotonina
SNC	Sistema nervioso central
TCA	Antidepresivos tricíclicos
VMN	Núcleo ventromedial del hipotálamo

RESUMEN

Actualmente, la depresión es un trastorno psiquiátrico con mayor prevalencia en la población. Uno de los fármacos para tratar la depresión es la clomipramina (CMI), la cual actúa inhibiendo la recaptura de serotonina (5-HT) y en menor medida de noradrenalina. Al respecto, se ha observado que la administración temprana de CMI en machos genera alteraciones en la conducta sexual, aumentando el número de montas y disminuyendo el número de intromisiones y de eyaculaciones, presentándose una mayor latencia a estas conductas, además de permanecer un menor tiempo explorando el área del incentivo sexual, lo que indica que no solo se altera el componente ejecutorio, sino también el componente motivacional. Mientras que en hembras dicho tratamiento genera alteraciones en el ciclo estral, induciendo ciclos extendidos, además de generar una disminución de la conducta sexual. Sin embargo, aún hace falta evaluar las concentraciones hormonales y los receptores hormonales en estructuras reproductivas. Por lo tanto, en el presente trabajo se evaluó el ciclo estral, la concentración de estradiol en suero y los receptores a estrógenos alfa ($RE\alpha$) que se encuentran en el útero y en los ovarios de ratas tratadas neonatalmente con CMI. Para esto se utilizaron sujetos de la cepa Wistar de 3 meses de edad y se formaron dos grupos; a) Grupo CMI, se le administró una dosis de 30 mg/kg de CMI del 8-21 días postnatal; b) grupo control, se le administró 0.1 ml de solución salina durante el mismo periodo, ambos grupos fueron administrados por vía subcutánea. A los tres meses de edad se evaluó el ciclo estral a través de frotis vaginal durante 21 días para determinar el número y el tipo de ciclo estral que presentaron en un periodo de 14 días. Una vez que se evaluó el ciclo estral se procedió a sacrificar a los animales para extraer las muestras sanguíneas en las fases de P-E y M-D para realizar la cuantificación de la concentración de estradiol, también se disectaron los cuernos uterinos y los ovarios para medir la expresión de los receptores a estrógenos alfa ($RE\alpha$). Nuestros resultados indican que el tratamiento neonatal con CMI disminuye el número de ciclos estrales, donde se puede apreciar que una mayor proporción de hembras CMI presentan ciclos extendidos, los cuales se caracterizaron por la presencia de más días de diestro. Además, las ratas CMI presentaron una disminución en la concentración sérica de estradiol durante las fases de P-E y una sobreexpresión de los $RE\alpha$ en útero durante todo el ciclo estral, mientras que en los ovarios la expresión de los $RE\alpha$ disminuyó durante las fases de P-E. Lo anterior sugiere que el tratamiento neonatal con CMI genera alteraciones en los procesos reproductivos durante la edad adulta.

INTRODUCCIÓN

La clomipramina (CMI) es un fármaco tricíclico que se utiliza para el tratamiento de la depresión, trastorno depresivo compulsivo y desorden del pánico (Trimble, 1990). También es utilizado por mujeres que sufren depresión durante la gestación y lactancia. Sin embargo, el uso de antidepresivos en mujeres embarazadas genera diferentes alteraciones en la progenie en los primeros días de vida, afectando principalmente los patrones de sueño, el sistema nervioso central (SNC), problemas gastrointestinales, cambios somáticos e hipertensión pulmonar (Belik, 2008) así como anomalías durante la edad adulta entre las cuales encontramos disminución de la actividad sexual, problemas de sueño, entre otras (Kim et al., 2013). Las acciones bioquímicas de este antidepresivo ocurren casi inmediatamente tras su administración, sin embargo, su efecto terapéutico se aprecia hasta después de transcurridas 2-4 semanas de tratamiento. El mecanismo de acción de la CMI es inhibir el transportador de serotonina (5-HT) (SERT) y en menor medida el de noradrenalina (NA), promoviendo que haya una mayor disponibilidad de estos neurotransmisores en el espacio sináptico (Judd et al., 1991).

La 5-HT también participa en diversos eventos críticos durante el desarrollo como la división celular, la diferenciación celular, la migración, la sinaptogénesis y la mielinización (Gaspar et al., 2003). Por tanto, las alteraciones en la concentración de 5-HT en etapas críticas pueden ser perjudiciales en la edad adulta generando anomalías en los procesos reproductivos (Gaspar et al., 2003; Homberg et al., 2010; Homberg y Lesch, 2011). Por otro lado, la 5-HT es regulada por los estrógenos, se ha visto que las concentraciones bajas de estrógenos afectan la síntesis de 5-HT ocasionando una disminución en su concentración y afectando la regularidad del ciclo estral modificando las fases del mismo (Zha et al., 2017). Además, estudios realizados en etapas tempranas del neurodesarrollo reportan que la 5-HT controla la proliferación de las células precursoras de las neuronas de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y su diferenciación, así como el aumento del número de neuronas GnRH en el cerebro anterior. Por lo tanto, la 5-HT parece contribuir a la

regulación del origen, diferenciación y migración de las neuronas de GnRH (Pronina et al., 2003). Durante la edad adulta la 5-HT regula la liberación de GnRH, la cual inicia la cascada de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (HHG).

Por ello es de suma importancia conocer más acerca del efecto de los tratamientos antidepresivos a largo plazo, por lo que el uso de modelos animales constituye una herramienta experimental que permite explorar los diferentes procesos fisiológicos que se modifican a largo plazo como los procesos involucrados en la reproducción.

1. ANTIDEPRESIVOS DURANTE EL EMBARAZO

La depresión es un trastorno que se observa con mucha frecuencia durante el embarazo, por lo que se ha considerado que este trastorno del estado de ánimo puede afectar hasta al 20% de las mujeres embarazadas (Marcus et al., 2003). Se ha reportado que la depresión no tratada en mujeres embarazadas genera consecuencias en el infante, tales como retraso en el desarrollo neurológico aproximadamente a los 18 meses de edad, problemas de desarrollo de lenguaje en los años posteriores y una reducción del coeficiente intelectual durante la adolescencia (Nulman et al., 2002; Deave et al., 2008; Hay et al., 2008). Por ello, es de suma importancia tratar adecuadamente la depresión durante el embarazo. Existen diversos fármacos que son usados para el tratamiento de la depresión, los de la primera opción son los inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (ISRS), inhibidores de la recaptura de 5-HT-norepinefrina (IRSN), aunque también se utilizan los antidepresivos tricíclicos (TCA). Se ha reportado que la exposición a fármacos antidepresivos durante la gestación ocurre a través del paso placentario a través del líquido amniótico, esta vía de exposición puede ser la que transmita concentraciones más altas de fármaco hacia el feto, además de causar efectos

adversos durante el neurodesarrollo (Loughhead et al., 2006). La lactancia también es una vía de exposición a fármacos antidepresivos hacia los neonatos ya que se sabe que dichos fármacos pueden excretarse por la leche materna, sin embargo, cada antidepresivo se almacena a cierta concentración en la leche materna. Se ha visto que las concentraciones altas de ISRS en la leche generan cólicos e irritabilidad en los lactantes como respuesta inmediata, sin dejar de lado las secuelas que puede causar al SNC que se encuentra en desarrollo en los neonatos (Spencer et al., 2001).

Existen muchas contradicciones respecto al uso de este tipo de fármacos durante el embarazo, aunque de forma general se ha reportado que la administración de antidepresivos durante el primer trimestre de gestación, compromete el desarrollo del cerebro del feto presentando alteraciones al nacer y durante los años posteriores. Por ejemplo, en los recién nacidos de madres expuestas a fármacos antidepresivos se ha reportado bajo peso al nacer, hipertensión pulmonar, resistencia vascular pulmonar, hemorragia intraventricular, y daño al SNC (Kieler et al., 2012).

En ratas que han sido expuestas a antidepresivos durante la gestación se ha demostrado que presentan alteraciones en la función del sistema 5-HTérgico el cual provoca daño a los procesos de división, diferenciación, migración, mielinización y sinaptogénesis (Gaspar et al., 2003). En humanos se ha observado que la alteración del sistema 5-HTérgico durante etapas tempranas del neurodesarrollo afecta diferentes procesos cerebrales en la edad adulta, tales como la cognición, la atención, el aprendizaje, el sueño, las emociones, la conducta sexual y la respuesta al estrés (Chaouloff et al., 1999; Vijayakumar y Meti, 1999). Estas anomalías presentadas en la edad adulta se deben a que los fármacos antidepresivos administrados durante la gestación o el periodo de lactancia actúan sobre el sistema 5-HTérgico alterando el neurodesarrollo del infante (Whitaker-Azmitia, 2001).

1.1 SEROTONINA (5-HT)

La 5-HT es una monoamina que se sintetiza a partir de la descarboxilación e hidroxilación del aminoácido L- triptófano (Pagano et al., 2017); se une a sus receptores, los cuales son una familia de receptores que van desde el 5-HT1 hasta el 5-HT7 (5-HT1A,1B, 1D, 1E, 1F; 2A, 2B, 2C, 3, 4, 5A, 5B, 6 y 7) están acoplados a proteínas G, excepto el 5HT3 de actividad ionotrópica (Millan et al., 2008). La concentración de 5-HT en el espacio sináptico dependerá de la síntesis, del mecanismo de recaptura y de la actividad de la monoamino oxidasa (MAO), enzima que se encarga de la degradación de las monoaminas (Pagano et al., 2017).

Las neuronas 5-HT (5-HTérgicas), a nivel del SNC, se encuentran en los núcleos del rafé ubicados en el tallo cerebral. A partir de aquí, la 5-HT es capaz de influir en la mayoría de las áreas del SNC (Carlson, 2006). En el cerebro de mamíferos los cuerpos celulares del sistema 5-HTérgico forman dos subdivisiones: una rostral y una caudal. Además, mediante técnicas de inmunohistoquímica, inmunofluorescencia y neurohistológicas se han podido identificar dos grupos de núcleos 5-HTérgicos de acuerdo a su origen embrionario: en núcleo superior y núcleo inferior. El primero inerva casi todo el mesencéfalo y está constituido por: el núcleo caudal lineal (NCL), el núcleo rafé medial (NRM), el núcleo de rafé dorsal rostral y caudal (NRD) y el núcleo lemniscus (NLM) o región supralemniscus. El grupo inferior se origina del mielencéfalo y está constituido por: núcleo de rafé obscurus (NRO), núcleo de rafé pallidus (NRP), núcleo de rafé magnus (NRMa), núcleo centro lateral medular (NVLM) y núcleo reticular intermedio (NRI) (Steinbushc y Nieuwenhuy, 1958). Asimismo, Dahiström y Fuxe en 1964 demostraron que las neuronas que contenían 5-HT podrían ser agrupadas en nueve núcleos que denominaron B1 a B9.

Por otro lado la 5-HT participa en procesos como la regulación del estado de ánimo, la conducta social, la alimentación, el sueño, la conducta sexual y los ritmos circadianos(Meltzer, 2002; Trueta y Cercós, 2012).

1.2 SEROTONINA (5-HT) Y NEURODESARROLLO

En los últimos años se ha explorado el papel de la 5-HT en los eventos neuroplásticos del desarrollo, reparación y degeneración el cerebro. La plasticidad sináptica es un proceso normal y fundamental para el desarrollo del SNC, el cual se lleva a cabo durante toda la vida del individuo. En este aspecto la 5-HT actúa como un factor de crecimiento durante la embriogénesis, y la activación de sus receptores forman parte de la cascada de eventos que conducen a cambios en la estructura del cerebro (Sodhi y Sanders-Bush, 2004). En el cerebro humano, las neuronas 5-HTérgicas aparecen en la 5ª semana de gestación (Sundström et al., 1993) y aumentan rápidamente hasta la 10ª semana de gestación, durante la semana 15 se puede observar la organización típica de los cuerpos celulares de 5-HT en los núcleos del rafé (Takahashi et al., 1986). La concentración de 5-HT aumenta lentamente los dos primeros años de vida y luego disminuye a la concentración de adultos a partir de los 5 años de edad (Benes et al., 2000). La densidad sináptica en la corteza cerebral humana se duplica desde el nacimiento hasta el primer año de edad alcanzando su máximo valor, el cual disminuye a los 10 años de edad (Huttenlocher y Dabholkar, 1997). La presencia de 5-HT en etapas tempranas en las regiones cerebrales puede regular el crecimiento interno y el desarrollo terminal de otras monoaminas, en particular la dopamina (Lambe et al., 2000). Ver figura 1.

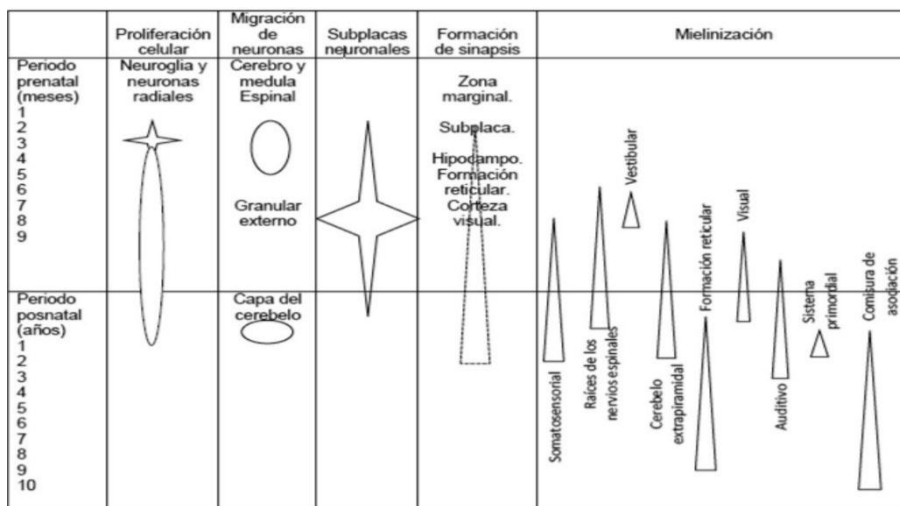


Figura 1.- Comparación de líneas de tiempo para procesos de desarrollo en humanos. El período prenatal de escala en meses y el desarrollo postnatal de escala en años. Tomada de Rice y Barone, 2000.

En ratas, las neuronas 5-HTérgicas del tallo cerebral son las primeras neuronas en diferenciarse y juegan un papel clave en la regulación de la neurogénesis. Se sabe que la 5-HT es uno de los primeros neurotransmisores que aparece en el SNC, por lo que se ha sugerido que funciona como una señal que estimula la proliferación, la diferenciación y la apoptosis celular (Verney et al., 2002). En la rata, las proyecciones axonales de los núcleos rostrales del rafé ascienden al cerebro medio y al cerebro anterior, mientras que las de los núcleos caudales descienden a la médula espinal (Wallace y Lauder, 1983). Las fibras descendentes ingresan en la médula espinal aproximadamente el día 14 del desarrollo embrionario e inervan a las neuronas simpáticas preganglionares y a las neuronas motoras somáticas. Posteriormente comienza a generarse el proceso de sinaptogénesis en el día 17 del desarrollo embrionario, las fibras mediales del fascículo anterior del cerebro se proyectan hacia el polo frontal del telencéfalo, mientras que las fibras laterales se proyectan hacia el hipotálamo y llegan al extremo rostral del cerebro, algunas cruzan la línea media en la comisura supraóptica. Las proyecciones rostrales son visibles poco después de que se detecta la 5-HT en el tronco encefálico. Asimismo, hay una entrada simultánea de fibras de 5-HT en el telencéfalo, la mayoría pasa a través de las bandas diagonales, las áreas septales, y luego se proyecta hacia la corteza cerebral (Rubenstein, 1998).

Otros estudios demuestran que durante el desarrollo la concentración de 5-HT se incrementa de manera significativa en el rafé dorsal durante el día 18 y 22 posnatal. También, se ha reportado que el transportador de 5-HT (SERT) es crucial para la eliminación de dicho neurotransmisor en la sinapsis y en la terminación de la señal 5-HTérgica relacionándose con la sinaptogénesis (Hansson et al., 1998). Por lo tanto, el transportador es otro componente importante del sistema 5-HTérgico involucrado en el desarrollo postnatal del sistema nervioso. En la rata, la densidad del transportador se incrementa en el día 7 y alcanza su nivel máximo al día 21 para decrecer progresivamente hasta el día 70 postnatal (Whitaker-Azmitia, 2001).

La eliminación de la 5-HT durante la etapa prenatal en ratas tiene como consecuencia una reducción permanente en el número de neuronas en el cerebro adulto en el hipocampo y la corteza (Lauder y Krebs, 1976). Asimismo, la 5-HT desempeña un papel crítico en la formación y en el desarrollo de las espinas dendríticas en el hipocampo y la corteza cerebral (Fabery y Haring, 1999). Sin embargo, conforme avanza el desarrollo cerebral la concentración de 5-HT disminuye (Norrholm y Ouimet, 2000).

Por otro lado, se ha propuesto un periodo crítico del desarrollo cerebral para el humano aproximadamente a partir de la 5ª semana de gestación hasta el nacimiento, y en la rata del día 8 al 21 postnatal (P8-P21). Este periodo coincide con la ventana crítica de crecimiento cerebral y un incremento en la sinaptogénesis (Anand y Scalzo, 2000). Estudios realizados en ratas tratadas neonatalmente con CMI han reportado que el periodo crítico para el neurodesarrollo se encuentra a partir del día 14 al 20 de edad postnatal, dichos animales presentan anormalidades conductuales significativas durante la edad adulta (Feng et al., 2001). Por lo tanto, el tratamiento neonatal con antidepresivos durante el periodo de desarrollo del sistema 5-HTérgico genera alteraciones en la concentración de 5-HT, lo cual tiene consecuencias sobre el desarrollo del SNC (Azmitia, 2001).

1.3 FÁRMACOS ANTIDEPRESIVOS Y NEURODESARROLLO

Existen fármacos antidepresivos que se utilizan en el tratamiento de los trastornos depresivos, enfermedades obsesivo-compulsivas, trastorno bipolar y en otras enfermedades mentales. Su efecto es incrementar la concentración de las monoaminas como 5-HT y/o NA en las neuronas 5-HTérgicas y noradrenérgicas respectivamente. La primera generación de antidepresivos llamados inhibidores de la (MAO) actúan inhibiendo la degradación de 5-HT, NA y dopamina, sin embargo, estos fármacos presentan efectos secundarios muy severos, ya que inducen un aumento en la presión arterial y pueden desencadenar algún accidente cerebro-

vascular en los pacientes que los consumen (Loughhead et al., 2006). La segunda generación, llamada antidepresivos tricíclicos (TCA), bloquean la recaptura o al transportador de 5-HT y NA. El bloqueo de los sistemas de recaptura incrementa la concentración de estos neurotransmisores en el espacio sináptico.

En los últimos años se han desarrollado nuevos fármacos antidepresivos denominados de tercera generación, los cuales son más específicos y selectivos ya que bloquean únicamente la recaptura de 5-HT. Dichos fármacos son conocidos como inhibidores selectivos de la recaptura de 5-HT (ISRS) (Azmitia, 2001) y tienen la nobleza de presentar menores efectos secundarios que los TCA y los IMAO. Cuando se administran fármacos antidepresivos como la CMI durante el periodo de desarrollo del SNC es posible que existan alteraciones y anomalías en la función cognitiva, sensorial y motora, tales alteraciones pueden estar interviniendo en la información que es recibida, interpretada y ejercida por el SNC (Azmitia, 2001).

La CMI es un fármaco antidepresivo tricíclico que actúa sobre los sistemas de neurotransmisión 5-HTérgico y noradrenérgico provocando que estas monoaminas permanezcan durante más tiempo en el espacio sináptico, por tanto, una concentración inadecuada de 5-HT y NA provoca un deficiente neurodesarrollo en etapas tempranas (Oberlander et al., 2006).

Por otro lado, se ha visto que los fármacos que se emplean para el trastorno de la depresión durante el embarazo generan alteraciones en el proceso de embriogénesis en el feto, provocando alteraciones en el desarrollo del tubo neural debido a que la placa neural todavía no se cierra completamente, lo que podría provocar anencefalia en el individuo en desarrollo (Belik, 2008; Liao y Lee, 2011). Además, se sabe que la exposición a los antidepresivos durante el tercer trimestre del embarazo genera complicaciones en los neonatos durante el nacimiento, tales como: problemas sensoriales, motores, parto prematuro, dificultad para respirar, cianosis durante la lactancia, problemas de talla, y apnea del sueño (Ward y Zamorski, 2002). Otros estudios realizados en ratas sobre el desarrollo cerebral, han demostrado que las manipulaciones farmacológicas durante la etapa neonatal mediante la administración de antidepresivos como la fluoxetina, sertralina, imipramina y desipramina generan cambios importantes que se presentan durante

la etapa adulta de la rata, entre los cuales se presentan alteraciones en los sistemas de neurotransmisión 5-HTérgico y noradrenérgico, además de inducir alteraciones en la actividad motora, en el ciclo del sueño (insomnio) y disminución de la conducta sexual masculina en el componente ejecutorio (Bonilla-Jaime et al., 1998).

Por otro lado, se ha reportado que la administración neonatal de CMI genera modificación en el ritmo circadiano de corticosterona, así como una respuesta alterada del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA) ante estímulos como el estrés y la conducta sexual masculina (Bonilla-Jaime et al., 2003). También se ha observado que existe una disminución de la proteína de unión al calcio S-100B, que es esencial para el crecimiento, diferenciación celular, síntesis de mielina, migración y destino neural (Pawluski et al., 2009). Asimismo, se ha reportado la reducción en la densidad y longitud de las espinas dendríticas de las células aferentes talamocorticales (Liao y Lee, 2011).

Se sabe, que la 5-HT se distribuye ampliamente en el cerebro, y sus vías de señalización son esenciales para numerosas funciones, incluida la conducta sexual (Olivier et al., 2010). Las áreas cerebrales críticas para la orquestación de comportamientos sexuales incluyen varios núcleos hipotalámicos entre los cuales se encuentran, el área preóptica medial, el núcleo del lecho de la estría terminal, la amígdala y las áreas olfativas, todas ellas con inervaciones 5-HTérgicas (Lu et al., 2003; Bonthuis et al., 2010; Veening y Coolen, 2014). Existe una fuerte evidencia de que la modulación 5-HTérgica de los comportamientos sexuales se produce principalmente a nivel del hipotálamo ventromedial (HVM) y del área preóptica (APO) (Kanno et al., 2008).

Por otro lado, los esteroides sexuales actúan sobre el cerebro en desarrollo y promueven el crecimiento neural. Además, pueden influir en el metabolismo de los neurotransmisores, la comunicación, conexión y el crecimiento neuronal, lo que puede conducir a cambios permanentes en la transmisión sináptica y la actividad neuronal en general. La 5-HT activa el proceso de diferenciación sexual durante el neurodesarrollo y por lo tanto al estar en contacto con el eje HHG activará los procesos reproductivos durante la edad adulta (Dohler, 1991).

Se ha demostrado que una serie de estructuras cerebrales y un gran número de funciones cerebrales son sexualmente dimórficas, también que el desarrollo y la diferenciación de estas estructuras y funciones se generan durante un período crítico pre y postnatal de mayor susceptibilidad, el cual es regulado por esteroides gonadales y neurotransmisores. El cerebro de los mamíferos machos y hembras parece estar todavía indiferenciado antes de que comience el período de mayor susceptibilidad a los esteroides gonadales y a los neurotransmisores, por tanto, estos factores internos son los que van a regular la maduración sexual del cerebro en etapas tempranas (Döhler, 1991).

1.4 EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVARIO

El aparato reproductor femenino de la rata se encuentra constituido por diferentes estructuras anatómicas las cuales se encuentran intercomunicados; con fines anatómicos podemos enumerarlos de acuerdo a su localización distal a proximal en: 1) ovarios, los cuales encuentran justo atrás de los riñones cuya función es producir estrógenos y células germinales femeninas susceptibles a ser fecundadas para generar nuevos individuos; 2) oviductos, los cuales se dividen regionalmente en infundíbulo, ampolla e istmo; 3) cuernos uterinos, estructuras bilaterales en donde cada cuerno es independiente y solo existe un solo cérvix, en donde se implantan los embriones y ocurre la gestación; 4) vagina cuya función es ser el receptáculo anatómico del miembro masculino y finalmente 5) vulva la cual es la región externa de todo el tracto reproductor femenino y donde se localiza la vaina clitoral (Villanueva y Hernández, 2004).

La producción de gametos está sujeta a un fino control de eventos neuroendócrinos regido por el eje hipotálamo- hipófisis- ovario (HHO), que se activa a través de la secreción de la GnRH. Esta hormona tiene un papel fundamental en la regulación del control neuroendocrino en la reproducción, ya que es la principal señal cerebral responsable de la síntesis y liberación de la hormona luteinizante

(LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Smith y Jennes, 2001). La FSH actúa sobre las células de la granulosa en el ovario estimulando el crecimiento y el desarrollo de los folículos, los cuales durante su crecimiento sintetizan estradiol. La LH estimula a las células de la teca para producir andrógenos, los cuales son captados por las células de la granulosa para ser aromatizados a estrógenos, por medio de la enzima aromatasa. Los estrógenos a su vez regulan el eje HHO, actuando a dos niveles: a) hipotalámico, estimulando y aumentando la descarga de GnRH, y b) a nivel de adenohipófisis, aumentando la sensibilidad de los gonadotrópos a la GnRH, lo que resulta en un aumento importante en la descarga de LH, induciendo la ovulación. De esta manera, el aumento de estradiol a nivel sérico por la maduración del folículo de Graff genera una retroalimentación positiva directamente en el eje HHO. Adicionalmente, los estrógenos pueden inhibir la secreción y liberación de GnRH, dando como resultado efectos de retroalimentación negativa (Redondo, 2003; d'Anglemont de Tassigny y Colledge, 2010), de tal manera que los estrógenos actúan en el HHO regulando diversos procesos reproductivos como son: la diferenciación sexual, el ciclo estral y la conducta sexual femenina.

Las concentraciones hormonales varían dependiendo de la fase del ciclo estral, es decir, durante el proestro la concentración de estradiol se encuentra en sus niveles más altos comenzando un decremento al iniciar el estro manteniéndose bajo durante el metaestro y a mediados del diestro; sin embargo, la concentración de estradiol comienza a aumentar a finales del diestro. Como bien se sabe la concentración de progesterona varía de forma similar que el estradiol. La LH alcanza su máxima concentración durante la etapa de proestro y finalmente la FSH se mantiene en altas concentraciones al final del proestro y a principios del estro y posteriormente disminuye en las siguientes fases del ciclo estral (Scharfman y MacLusky, 2006). Ver figura 2.

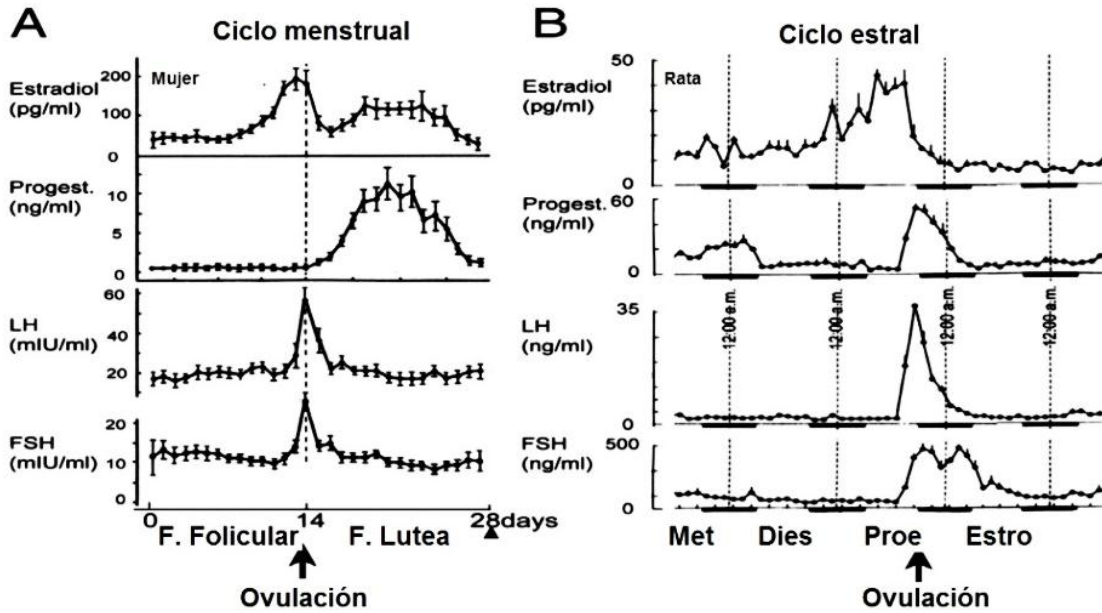


Figura 2. Mediciones hormonales de 17β -estradiol, progesterona, hormona luteinizante (LH) y hormona folículo estimulante (FSH) durante el ciclo menstrual. B. Mediciones hormonales durante el ciclo estral de la rata. Tomada de Scharfman y MacLusky, 2006.

Por lo tanto, el eje HHO será el encargado de regular todos los procesos reproductivos por medio de la secreción y liberación de hormonas, entre las cuales encontramos a los estrógenos.

1.5 ESTRÓGENOS

Los estrógenos forman parte del grupo de hormonas esteroideas que participan en el proceso de diferenciación sexual durante el neurodesarrollo, así como en el mantenimiento de las características sexuales secundarias femeninas, además, intervienen en la regular el ciclo estral y aseguran el buen funcionamiento del eje HHG (Rochira et al., 2005).

Durante la etapa prenatal el cerebro se encuentra expuesto tanto al estradiol que produce la madre, como al que es sintetizado localmente por las propias gónadas del feto. Se sabe que durante el desarrollo el cerebro expresa altos niveles de receptores a estrógenos (RE) (Bakker et al., 1997). Los estrógenos actúan en el

cerebro en desarrollo, preconditionando la red neural para que en el adulto las hormonas ejerzan la respuesta correcta (Calizo y Flanagan-Cato, 2000).

Por otro lado, las acciones de los estrógenos en el cerebro en desarrollo son generalmente permanentes y generan diferencias sexuales, de hecho, la aromatasas cerebral, al regular los niveles locales estrogénicos, participa en la diferenciación sexual de las regiones del cerebro implicadas en el control de la secreción de gonadotropinas y del comportamiento sexual que tiene lugar durante el desarrollo (Fusani y Gahr, 2006). En la edad adulta los estrógenos serán sintetizadas principalmente en los ovarios, aunque en menor cantidad, también serán sintetizados en la corteza suprarrenal y el tejido adiposo, así como en la placenta durante el embarazo (Boukari et al., 2017). Su síntesis tiene lugar a partir del colesterol (López y Tena-Sempere, 2016). Se pueden distinguir distintos tipos de estrógenos en el plasma, tales como el estriol, la estrona y el 17β -estradiol, siendo este último el principal estrógeno secretado. Los estrógenos como el 17β -estradiol, son producidos a partir de la aromatización de andrógenos como la testosterona por función de la enzima aromatasas principalmente en los ovarios. Los estrógenos ejercen sus funciones biológicas mediante su unión a los RE, los cuales pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares (Lemini-Guzmán, 2008).

1.5.1 RECEPTORES A ESTRÓGENOS

Existen dos subtipos del RE codificados por genes distintos y son conocidos como RE α y RE β (Sharma et al., 2017). Los RE están conformados por seis dominios denotados de la A a la F (Kuiper et al., 1997). Tienen un dominio central de unión al ADN (DBD) que se encuentra muy conservado entre ambos receptores. Sin embargo, en los dominios restantes presentan una elevada variabilidad lo que implica una distinta afinidad por el ligando y la generación de diversos efectos, incluso opuestos, en función del tipo celular o del tejido en el que se encuentran (Richard et al., 2017). En ellos se pueden distinguir varios dominios que difieren funcionalmente: el dominio amino-terminal de interacción con otras proteínas y

activación de la transcripción (AF1), el dominio de unión al DBD, el dominio carboxilo-terminal de unión al ligando y transactivación (LBD/AF2), el dominio que contiene la señal de localización nuclear (D) y, finalmente, el dominio encargado de modular la actividad del receptor (F). De hecho, ambos subtipos de RE se expresan en varios tejidos y tipos celulares de manera diferencial, lo que también contribuye a la posibilidad de que existan distintos genes bajo el control de cada subtipo dependiendo del tipo celular, así como modelos de acción que podrían incluir cooperación o bien competición entre $RE\alpha$ y $RE\beta$ (Dworatzek y Mahmoodzadeh, 2017).

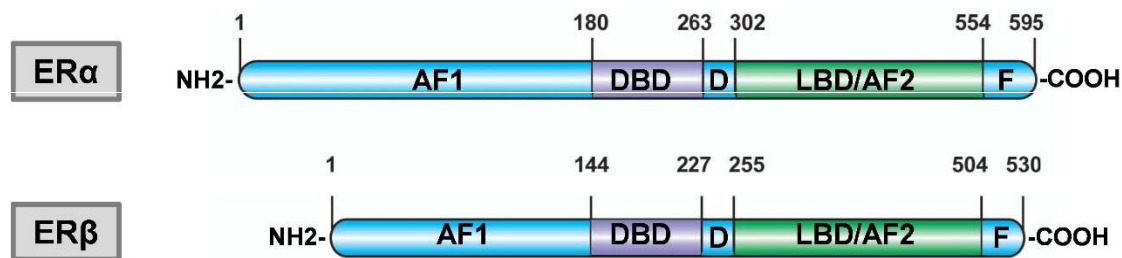


Figura 3.- Esquema de los dominios funcionales de los receptores de estrógenos α y β ($ER\alpha$ y $ER\beta$). Tomada de Lanzino et al., 2001.

De este modo, tras la interacción hormona-receptor, llevan a cabo acciones lentas o genómicas que suponen la regulación de la transcripción génica de determinados genes que se encuentran bajo su control. Además, los estrógenos también ejercen acciones rápidas o no genómicas que, abarcan distintas vías de acción (Chandrasekar et al., 2010).

Los $ER\alpha$ se encuentran localizados en el útero, en los ovarios, en las glándulas mamarias y también se sabe que se encuentran distribuido en el SNC, mientras que el $ER\beta$ se localiza en las células del endotelio vascular, el sistema nervioso, testículos y hueso. De esta manera los estrógenos regulan diferentes procesos reproductivos. En humanos actúan en la diferenciación sexual a nivel cerebral durante el desarrollo temprano, la formación de las características sexuales secundarias femeninas y el ciclo menstrual; asimismo en la rata regulan el ciclo estral y el despliegue de la conducta sexual (Bondesson et al., 2015).

1.6 CICLO ESTRAL

El ciclo estral se ha definido como el periodo de inicio del celo o estro hasta el inicio del siguiente (Ramírez 2006), durante el ciclo estral suceden cambios morfológicos, histológicos y hormonales en los órganos reproductivos. Estos procesos se encuentran regulados neuroendocrinamente por el eje HHO (Rosell, 2004).

En la rata el ciclo estral está conformado por cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro; cada una de estas fases varía en cuanto a su duración y está determinada por características citológicas específicas que pueden identificarse a través de un frotis vaginal (Goldman et al., 2007). A continuación, se describe brevemente la fisiología de cada fase del ciclo estral.

A) La fase de proestro tiene una duración aproximadamente de 12 horas, en donde los ovarios se encuentran en la fase folicular, a principios de esta fase se encuentran niveles altos de estrógenos, manteniéndose uniformes durante la mitad de la fase (Puerta y López, 2005), ver figura 5. Por otro lado, las paredes vaginales se engrosan y se tornan secas y comienzan a producir cornificación de las células de la mucosa, las células epiteliales vaginales se muestran grandes, redondeadas y nucleadas (Marcondes et al., 2002), ver figura 4.

B) La segunda fase que forma parte del ciclo estral es el estro, que tiene una duración aproximadamente entre 9 y 15 horas, durante esta fase se realiza la ruptura del folículo ovárico y la ovulación, los estrógenos desencadenan los cambios conductuales en la hembra, los cuales son la conducta proceptiva y receptiva, en esta fase las células epiteliales vaginales se pueden observar descamadas y transparentes (Marcondes et al., 2002), ver figura 4.

C) La tercer fase del ciclo estral es la denominada metaestro, que tiene una duración de aproximadamente 15 horas, en esta fase se produce el pico de LH y por consecuencia la ovulación, en los 2 días posteriores hay un incremento de la FSH, a principios de esta fase los niveles de estrógenos disminuyen, el cuerpo lúteo comienza a formarse y se incrementa la producción de progesterona, ver figura 5, al final del metaestro se observa la vagina húmeda, los óvulos que se han liberado se encuentran en el oviducto (Marcondes et al., 2002; Zheng, 2009). Las células

epiteliales vaginales que se observan son células epiteliales cornificadas y algún leucocito, ver figura 4.

D) La última fase del ciclo estral es el diestro, que se caracteriza por tener mayor duración en el ciclo aproximadamente de 57 horas. En la etapa temprana de esta fase los niveles de estrógenos se incrementan, el cuerpo lúteo produce niveles altos de progesterona (Marcondes et al., 2002), posteriormente la progesterona que se ha producido comienza a disminuir lo que provoca que haya una producción de FSH, por otro lado, la LH comienza nuevamente con el desarrollo de nuevos folículos (Puerta-López, 1994) y se observan células epiteliales vaginales cornificadas y abundantes leucocitos, ver figura 4.

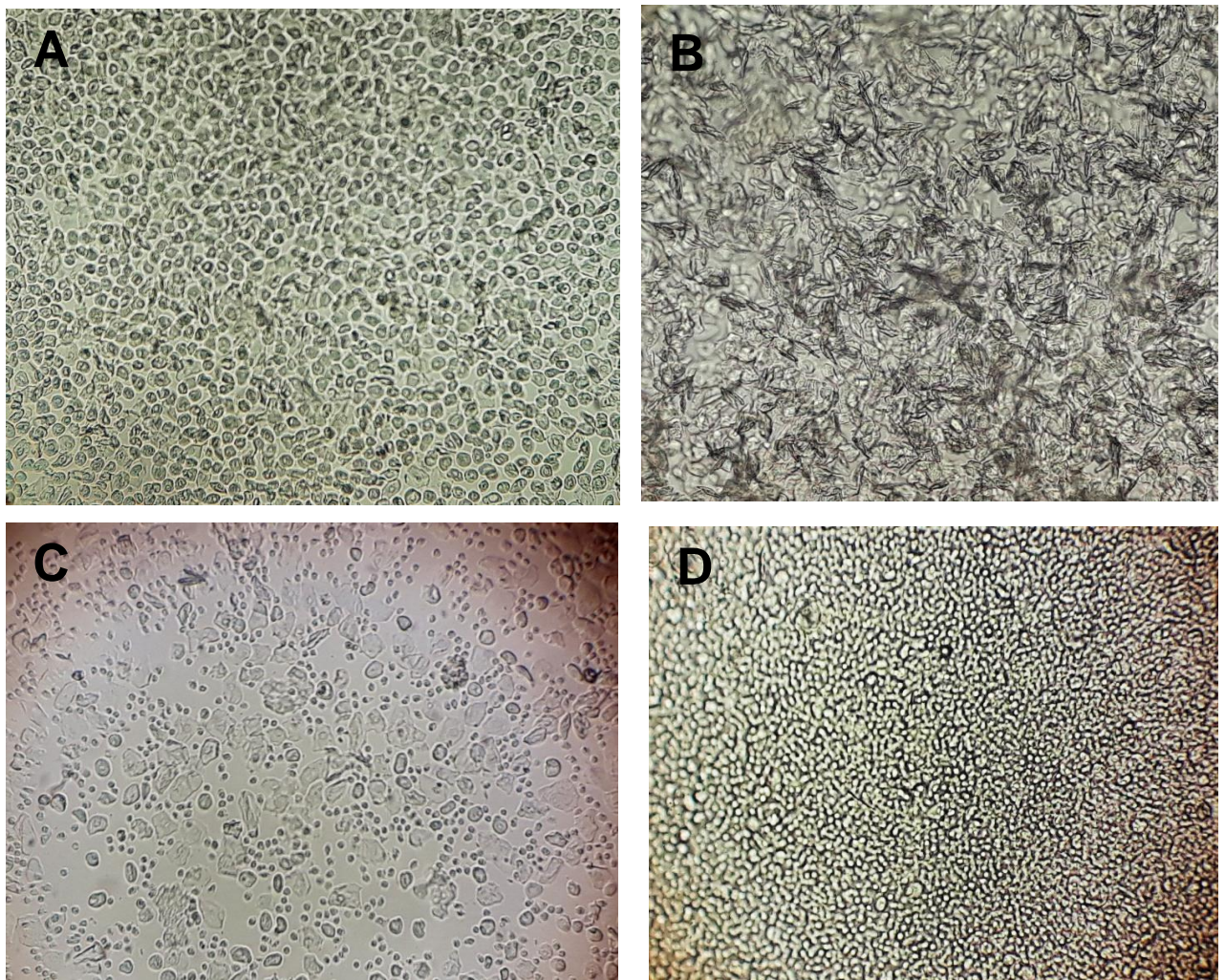


Figura 4. Frotis vaginal de ratas hembras en proestro (A), estro (B), metaestro (C) y diestro (D) (Tomada con objetivo 10X en el bioterio de la UAM Iztapalapa).

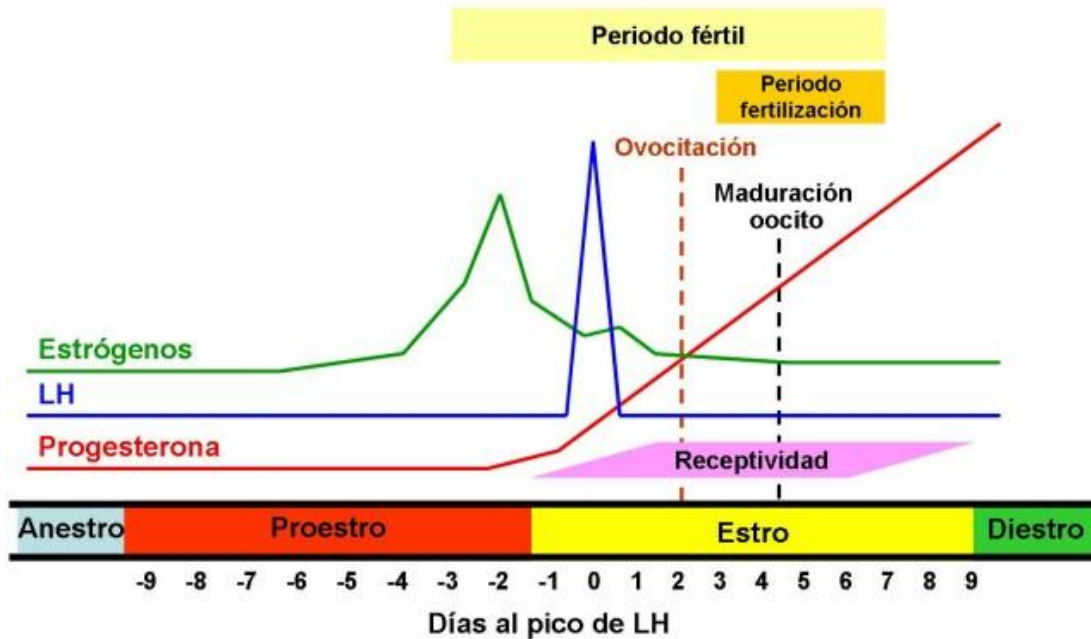


Figura 5. Fases del ciclo estral y los niveles de estradiol en la rata. Podemos observar que los niveles más altos se encuentran en la fase de proestro y los más bajos en la fase de estro. Tomada de Levine, 2015.

Cabe señalar que el ciclo estral no solo es un proceso regulado por diversas hormonas tales como la LH, progesterona y los estrógenos, sino también por neurotransmisores entre los cuales se encuentra la 5-HT y algunos de sus receptores juegan un papel importante en la modulación de los parámetros reproductivos.

1.7 SEROTONINA Y CICLO ESTRAL

En los mamíferos, la 5-HT participa en una amplia gama de procesos reproductivos como en la secreción de GnRH, la liberación de gonadotropinas, la maduración gonadal y los procesos socio-sexuales. En varias especies de mamíferos, las neuronas 5-HTérgicas expresan RE β (Gundlah et al., 2005) por lo tanto el sistema 5-HTérgico puede ser regulado por factores hormonales como los estrógenos (Prasad et al., 2015) lo cual sugiere que la 5-HT y las vías de señalización

endócrinas reproductivas están estrechamente asociadas controlando los procesos reproductivos mediante el mecanismo de retroalimentación negativa de los esteroides sexuales hacia el hipotálamo y la hipófisis (Fink, 1979). Por otro lado, las neuronas 5-HTérgicas envían sus proyecciones hacia las neuronas GnRH que se encuentran ubicadas en el hipotálamo, empleando el uso de neurotransmisores como la 5-HT (Campbell y Herbison, 2007). En el hipotálamo, la 5-HT participa en la modulación de la secreción de la GnRH y a su vez, GnRH estimula la secreción de las gonadotropinas, la FSH y la LH, en la hipófisis (Wada et al., 2006).

En estudios realizados en ratas hembras han demostrado que los axones 5-HTérgicos envían sus proyecciones a las neuronas GnRH, por lo que se sugiere que la 5-HT tiene un papel directo en la regulación de la actividad de las neuronas GnRH (Vitale y Chiochio, 1993). Por otro lado, se ha demostrado la presencia de 5-HT en la capa de tejido muscular que se encuentra en oviducto, útero y ovario de rata por medio de la técnica de HPLC con detección electroquímica; mientras que su origen se atribuye a las terminales nerviosas que se extienden dentro del ovario, además de que las fluctuaciones de la concentración de 5-HT en estos tejidos se relacionan con las diferentes etapas del ciclo estral (Amenta et al., 1992). Esta idea se ve reforzada por el hecho de que en los folículos preovulatorios la secreción de estradiol es estimulada por la 5-HT, el estradiol en concentraciones adecuadas promueve la ovulación (Tanaka et al., 1993), la cual que se lleva a cabo cuando la 5-HT se une y activa al receptor 5-HT₂ para estimular la secreción de GnRH, FSH y LH (Gouveia y Franci, 2004). La 5-HT se ha identificado en las células del cúmulo y células de la granulosa; asimismo se ha reportado la presencia de SERT en el ovario de rata (Amireault y Dubé, 2005). La presencia de tales elementos del sistema 5-HTérgico en el ovario apunta la posibilidad de que la 5-HT desempeñe un papel en la esteroidogénesis.

Como ya se mencionó, durante el ciclo estral, se presentan fluctuaciones en la concentración de 5-HT asociada a la ovulación, considerándose que la 5-HT tiene un papel muy importante dentro de la regulación ovárica, observándose altas concentraciones de 5-HT durante la fase de estro (Clausell y Soliman, 1978). Aunado a esto, la 5-HT está implicada en la secreción de hormonas que regulan la

maduración sexual, asimismo, actúa en el inicio de la pubertad de la rata hembra (Romero-Reyes et al., 2016). Al respecto, existen estudios sobre la exposición a fluoxetina durante la etapa postnatal (0-28 PN) en donde se observa la facilitación de la conducta sexual femenina en ratas adultas (Rayen et al., 2014). De manera contraria, la exposición de fluoxetina durante la gestación y periodo de lactancia aumenta la concentración de estradiol, incrementa el número de folículos en el ovario, retrasa la pubertad y modifica genes que regulan la señalización y acción de la 5-HT en el ovario (Moore et al., 2015; dos Santos et al., 2016). También se ha evaluado el tratamiento de fármacos antidepresivos en ratas macho mediante la administración neonatal con CMI, y se ha observado que dicho tratamiento genera anomalías en la conducta sexual masculina (Bonilla-Jaime et al., 1998; Limón-Morales et al., 2014).

Por tanto, el uso de fármacos antidepresivos en etapas perinatales y posnatales altera el sistema 5-HTérgico generando anomalías en algunos parámetros reproductivos durante la edad adulta.

1.8 TRATAMIENTO NEONATAL CON CMI

La CMI es un antidepresivo tricíclico que se utiliza para el tratamiento de la depresión, trastorno depresivo compulsivo y desorden del pánico (Trimble, 1990). La CMI está constituida por un anillo central con siete elementos y un nitrógeno terminal que contiene tres elementos (aminas terciarias) (Figura 6). Las acciones bioquímicas de este antidepresivo ocurren casi inmediatamente tras su administración, su efecto terapéutico no se aprecia hasta después de transcurridas 2-4 semanas de tratamiento. El mecanismo de acción de la CMI es inhibir el transportador de 5-HT (SERT) y en menor medida el de noradrenalina (NA), promoviendo que haya una mayor disponibilidad de estos neurotransmisores en el espacio sináptico (Judd et al., 1991).

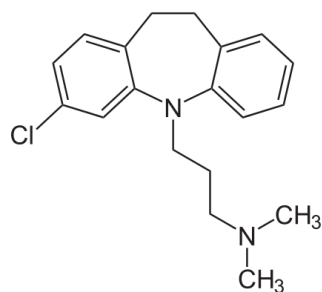


Figura 6.- Estructura química de clomipramina

A nivel clínico, la CMI es un antidepresivo que puede ser utilizado para el tratamiento de depresión durante la gestación (Gentile, 2014). Inclusive ya se ha reportado que este fármaco es liberado en la leche materna y recibido por él bebe durante la lactancia (Thomson y Sharma, 2017). El uso de CMI en mujeres embarazadas induce efectos en los recién nacidos entre las cuales podemos mencionar nacimientos prematuros, problemas respiratorios, anomalías cardiovasculares e irritabilidad, bajo peso en recién nacidos, problemas en la ingestión de alimento y algunas veces suelen presentar convulsiones (Cowe et al., 1982; Bromiker y Kaplan, 1994; Källén y Otterblad Olausson, 2003). Sin embargo, poco se sabe sobre las alteraciones durante la edad adulta de neonatos expuestos en etapas críticas del neurodesarrollo.

En ratas macho, el tratamiento neonatal con CMI durante los días 14 al día 20 PN reportan alteraciones en la sinaptogénesis lo cual es sabido que genera deficiencias conductuales, endocrinas y fisiológicas en la edad adulta (Vogel et al., 1990b; Feng et al., 2001). Dentro de las alteraciones conductuales se observa disminución en las respuestas de lucha, anomalías del sueño MOR, hiperactividad motora, disminución en la agresividad, desesperanza evaluada en la prueba de nado forzado, además de presentar alteraciones fisiológicas como hipersecreción de corticosterona, alteraciones en los sistemas de neurotransmisión (Vogel et al., 1990; Velázquez-Moctezuma y Díaz Ruiz, 1992; Yanielli et al., 1995; Bonilla-Jaime et al., 1998; Feng et al., 2001), y de las conductas de búsqueda de recompensa como la conducta sexual (Neil et al., 1990; Bonilla-Jaime et al., 1998; Limón-Morales et al., 2014), alteraciones en los parámetros del sueño REM y procesos

cognitivos que pueden afectar el aprendizaje y la memoria(Vogel et al., 1990; Feng et al., 2001; Bhagya et al., 2008; Savelyev et al., 2012). Además de presentar alteraciones neuroquímicas en los sistemas de neurotransmisión dopaminérgico y 5-HTérgico (Andersen et al., 2002) se ha descrito la hiperactividad del eje HPA (Bonilla-Jaime et al., 2010). Por otro lado, estudios realizados en hembras reportan que el tratamiento neonatal con CMI genera desesperanza y alteraciones en el ciclo estral y la conducta sexual femenina (Molina-Jiménez et al., 2018). Esta última es una conducta que se encuentra intrínsecamente regulada por las hormonas esteroideas, principalmente el estradiol, sintetizado por los ovarios, los cuales a su vez son regulados por el eje HHO.

1.9 ANTECEDENTES

Se ha observado que el tratamiento neonatal con CMI altera la conducta sexual masculina durante la edad adulta, aumentando el número de montas y disminuyendo el número de intromisiones y eyaculaciones en los sujetos experimentales, además se presenta una mayor latencia a estas conductas y permanecen menor tiempo explorando el área del incentivo sexual, lo que indica que no solo se altera el componente ejecutorio sino también el componente motivacional (Neil et al., 1990; Bonilla-Jime et al., 1998; Limón-Morales et al., 2014), estas alteraciones son revertidas por la administración de estradiol más dihidrotestosterona, hormonas esteroideas involucradas en la expresión de la conducta sexual masculina. Sin embargo, las concentraciones periféricas de testosterona y estradiol no se ven afectadas por el tratamiento neonatal con CMI. Por otro lado, el tratamiento neonatal con CMI induce una disminución en la expresión de los RE β en el núcleo del rafe dorsal y en la región CA3 del hipocampo, mientras que en el núcleo preóptico medial (NPOm) se observó un aumento en la expresión de los RE α y RE β , estos resultados nos podrían indicar el probable

mecanismo por el cual la CMI produce las alteraciones en la CSM (Limòn-Morales et al., 2014).

En hembras la administración neonatal de CMI genera ansiedad en la prueba de laberinto en cruz y se presentan alteraciones en los sistemas de neurotransmisión (5-HTérgico y dopaminérgico), caracterizadas por una disminución de 5-HT y dopamina en el lado derecho del hipocampo, amígdala y estriado (Andersen et al., 2002). Además, se observó que el tratamiento con CMI genera desesperanza en la prueba de nado forzado, donde los animales CMI tuvieron mayor tiempo de inmovilidad y un menor nado, efecto que fue revertido con el tratamiento crónico con estradiol (Molina-Jímenez et al., 2017). En el ciclo estral, las hembras CMI presentaron una disminución en el número de ciclos, con una mayor proporción de ciclos extendidos y una reducción de la conducta sexual (Molina-Jímenez et al., 2018), lo cual nos indica que el tratamiento neonatal con CMI aumenta la concentración de 5-HT y altera los procesos reproductivos como el ciclo estral y la conducta sexual tanto masculina como femenina.

Sin embargo, no se ha evaluado la concentración sérica de estradiol y los RE α en estructuras reproductivas como útero y ovarios, los cuales son muy importantes en los procesos reproductivos.

2. JUSTIFICACIÓN

El uso de antidepresivos durante el embarazo y la lactancia se ha incrementado en un 300% desde 1998 al 2005. En este sentido, actualmente existen diversas terapias farmacológicas para el tratamiento de la depresión, dentro de las cuales, la primera elección son los ISRS, como la fluoxetina. Sin embargo, también existen aquellos de segunda elección como la CMI, que al ser administrada durante la gestación o lactancia genera alteraciones en el producto. Dichas alteraciones son

bajo peso al nacer, problemas respiratorios y cardiacos, así como dificultad para comer (Bromiker y Kaplan, 1994; Källén y Otterblad Olausson, 2003).

La CMI actúa a nivel de SNC modulando las concentraciones de noradrenalina y 5-HT principalmente, y se ha visto que la 5-HT y su transportador (SERT) regulan el ciclo estral de la rata mediante la secreción de estradiol el cual tiene como función regular los cambios en el epitelio vaginal que se presentan en cada etapa del ciclo (Rehavi et al., 2000a).

En modelos animales se sabe que el tratamiento neonatal con CMI induce alteraciones en el despliegue y el componente motivacional de la conducta sexual así como en la expresión de RE α y β en el hipotálamo en machos adultos (Bonilla-Jaime et al., 1998; Limón-Morales et al., 2014), en hembras genera desesperanza, altera el ciclo estral y la conducta sexual femenina (Molina-Jiménez et al., 2017; Molina-Jiménez et al., 2018).

Por lo tanto, la alteración en la actividad del sistema 5-HTérgico durante el neurodesarrollo a través del uso de fármacos antidepresivos como la CMI genera cambios, con una posible consecuencia en las funciones ováricas y a su vez en la reproducción del organismo. Hoy en día existen pocos trabajos que indican que la CMI modifica algunos parámetros reproductivos, por ello, en este trabajo se evaluaron los efectos de CMI sobre aspectos fisiológicos de la conducta sexual femenina como el ciclo estral, la concentración sérica de estradiol durante el ciclo estral y las posibles modificaciones en los RE α que se encuentran en el útero y los ovarios.

Los resultados obtenidos aportarán información importante respecto a los posibles efectos deletéreos que puede estar ocasionando la exposición de fármacos antidepresivos en etapas tempranas sobre la población femenina.

2.1 PREGUNTA DE INVESTIGACIÓN

¿Cuáles son los efectos que tendrán las ratas hembras administradas con CMI durante la etapa neonatal, sobre el ciclo estral, la expresión RE α en aparato reproductor (útero y ovarios) y la concentración de estradiol en sangre?

2.2 HIPÓTESIS

La administración de CMI en la etapa neonatal modifica la concentración de estradiol, la expresión de RE α en ovarios y útero alterando el ciclo estral en rata hembra adulta de la cepa Wistar adultas.

2.3 OBJETIVO GENERAL

Analizar el efecto de la administración neonatal de CMI en ratas hembras sobre la concentración de estradiol, la expresión del RE α en útero y ovarios en diferentes fases del ciclo estral.

2.4 OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto del tratamiento neonatal de CMI sobre las fases del ciclo estral de la rata.
- Evaluar el efecto del tratamiento neonatal con CMI sobre la concentración de estradiol en las diferentes fases del ciclo estral de la rata.
- Evaluar el efecto del tratamiento neonatal con CMI sobre la expresión de los RE α en útero y ovarios durante las diferentes fases del ciclo estral de la rata.

2.5 MATERIAL Y MÉTODO

2.6 SUJETOS EXPERIMENTALES

El presente proyecto de investigación que se basó en la Norma Oficial Mexicana NOM-062-ZOO-1999 “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio “. Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar de 3 meses de edad que fueron criadas en el bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Iztapalapa; los sujetos experimentales fueron mantenidos en un ciclo de luz-oscuridad de 12:12 horas encendiendo la luz a las 22:00 horas con una temperatura de 24 °C, con agua y alimento *ad libitum*.

2.7 TRATAMIENTO NEONATAL CON CMI

Como parte del modelo de tratamiento neonatal con CMI, se utilizaron 9 hembras gestantes a partir de las cuales, a los 3 días posteriores al parto, las crías fueron sexadas y separadas de la madre para seleccionar únicamente a las hembras mientras que los machos fueron utilizados para otros fines experimentales. Este periodo de separación se utilizó con el fin de evitar que los sujetos experimentales presentaran ansiedad y/o estrés por separación de la madre (Riveros-Barrera y Dueñas, 2015). Las hembras fueron colocadas con una nodriza en una caja de acrílico, de tal manera que el número de crías por cada nodriza se estandarizó a 6 crías. Posteriormente se formaron 2 grupos experimentales: 1) el grupo control al cual únicamente se le administró 0.1ml de solución salina por vía subcutánea diariamente del 8 al día 21 de vida posnatal; 2) el grupo CMI, al cual se le administró 30mg/kg de clorhidrato de clomipramina una vez al día a las 11 am a partir del día 8 al día 21 de vida posnatal, vía subcutánea (Vogel et al., 1988).

A los 21 días de edad se realizó el destete y los individuos fueron colocados en cajas de acrílico en grupos de 6 animales, respetando el tratamiento al cual

fueron sometidos. A los 3 meses de edad, se registró diariamente el ciclo estral a través de frotis vaginales durante 21 días, de los cuales 7 días fueron de habituación, con el fin de identificar el tipo de ciclo presentado, posteriormente se formaron grupos de acuerdo a las fases del ciclo estral, agrupando a en proestro-estro y metaestro- diestro para darles muerte por decapitación y obtener las muestras sanguíneas, además de realizar la extracción de las estructuras reproductivas (ovario y cuernos uterinos).

2.8 CICLO ESTRAL

Para analizar el efecto que tiene la CMI durante la etapa neonatal sobre el ciclo estral se realizaron frotis vaginales durante 21 días. Los frotis se obtuvieron con un gotero de vidrio que contenía una pequeña cantidad de solución salina insertando la punta del gotero en la vagina de la rata con mucho cuidado para no lastimarla, la punta del gotero se introdujo en la entrada vaginal. Posteriormente la muestra se colocó en un porta objetos y se observó en un microscopio de luz en los objetivos 10X y 40X para determinar mediante citología vaginal la fase del ciclo estral en la cual se encontraba la rata: proestro (células redondas y nucleadas), estro (células cornificadas), metaestro (mezcla de células redondas, nucleadas, células cornificadas y leucocitos) y diestro (predominio de leucocitos) (Marcondes et al., 2002). El tipo de ciclo se clasificó de la siguiente manera: a) regular, caracterizado por 4 o 5 días con 1-2 días de estro o 2-3 días de diestro; b) extendido, caracterizado por la presencia de 3-4 días de estro o 4-5 días de diestro; y 3) anormal, caracterizado por más de 4 días consecutivos de estro o 6 días de diestro (Goldman et al., 2007).

2.9. CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL POR MEDIO DE LA PRUEBA DE RIA

La cuantificación de estradiol se realizó mediante la prueba de radioinmunoanálisis (RIA) en ambos grupos de individuos. A los 3 meses de edad las ratas se sacrificaron por decapitación (no se pudo utilizar ningún tipo de anestesia ya que podía influir en la cuantificación hormonal) en cada una de las fases del ciclo estral (estro, metaestro, diestro y proestro) para obtener las muestras de sangre y realizar la cuantificación hormonal. Las muestras de sangre fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 30 minutos para obtener el suero y poder evaluar los niveles de estradiol haciendo uso del kit comercial TKE-21 (Diagnostic Product Corporation, CA, Estados Unidos). El método consistió en un RIA con marcador ^{125}I , diseñado para la determinación cuantitativa de estradiol. El procedimiento se describe a continuación; se utilizaron tubos recubiertos con anticuerpos (anti-estradiol), en donde la hormona marcada con ^{125}I compite por los sitios de unión al anticuerpo con la hormona presente en la muestra. Luego de la incubación, los tubos fueron introducidos en el contador gamma (Cobra, Packard, Estados Unidos) donde la cantidad de cuentas leídas están inversamente relacionadas con la cantidad de hormona presente en la muestra. La cantidad de hormona presente en la muestra se determinó comparando las cuentas con una curva de calibración.

3. EXPRESIÓN DE $\text{RE}\alpha$

El tejido disectado (cuernos uterinos y ovarios) se limpió con solución salina, se utilizó un aproximado de 0.30gr – 0.50 gr de tejido fresco, que fue pre tratado en 1ml de ARN later (QIAGEN Science, Germantown, MD, EE.UU.) 24h a temperatura ambiente, posteriormente el tejido se almacenó a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el día de su utilización. Para procesar las muestras, el tejido se descongeló y se eliminó el excedente de ARN later con una gasa estéril, el tejido se colocó en 1 ml de reactivo de lisis Quiazol y se homogenizó con el aparato politrón; una vez que el tejido se

homogenizó, se adicionaron 200 µl de cloroformo, se dejó reposar 10 min y centrifugar a 12000 rpm durante 15 min a 4 °C. La fase acuosa fue recuperada y se adicionaron 500 µl de isopropanol, dejando reposar 30min y centrifugando 12000rpm 15min 4 °C. El sobrenadante se decantó y el botón se lavó con alcohol, posteriormente el botón se disolvió con 35µl de agua inyectable y se analizó la pureza del ARN usando 5 µl de la mezcla anterior en el Nano Drop- 2000. Para comprobar la integridad del ARN se realizó un gel de agarosa al 1% con red gel. A partir de ARN total y usando el sistema de transcripción inversa ImProm II (Promega, Madison, WI, EE.UU.), se obtuvo un cDNA (ácido desoxirribonucleico complementario); la reacción se realizó siguiendo las indicaciones del proveedor, dicha reacción de 20 µl se incubo en un termociclador (Applied Biosystems GeneAmp PCR System 2700HT, Foster City, E.E.U.U) con el programa de ciclos: incubación de 5 min a 25 °C, extensión de 55 min a 42 °C, la enzima fue inactivada a 70 °C por 15min, las muestras se enfriaron a 4 °C por 5min, el cDNA que se obtuvo fue amplificado con Master Mix (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) y las reacciones se evaluaron en un sistema de tiempo real LightCycler 2.0 (Roche Molecular Biochemicals), con 0.5mM de primer (tabla 1) , las reacciones finales fueron condicionales para la PCR en tiempo real que fueron pre incubadas con la enzima: 10min a 95 °C, 40 ciclos con desnaturalización a 95 °C por 10 segundos, temperatura de alineamiento 61 °C por 7 seg, amplificación a 72 °C por 10 seg.

Los valores ΔCt se calcularon con Ct de problema – Ct de referencia donde GAPDH se tomó como el gen de referencia, los cambios relativos en la expresión de un gen en específico ($\Delta\Delta Ct$) se calcularán con el ΔCt de la muestra menos el ΔCt de la referencia y se representara como $2^{-\Delta\Delta Ct}$

Tabla 1. Secuencia de oligonucleótidos para la cuantificación de la expresión del RNAm de RE α .

Gene	Secuencia (F- sentido/ R- antisentido)	Gene Bank	Tamaño del producto
GAPDH	F- CCTGCACCACCAACTGC R- CAATGCCAGCCCCAGCA	NM_017008.4	453pb
RE α	F- TTCACACCAAAGCCTCGGG R- TGCAGCAGCATCAGCGGA	XM_0062278 32.2	337pb

3.1 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Para comparar el número de ciclos estrales se realizó una prueba t de Student para grupos independientes, donde los grupos fueron CMI (tratamiento neonatal con clomipramina) vs CTRL (tratamiento neonatal con solución salina), con una significancia de $p < 0.05$.

El porcentaje de hembras que presentaron ciclo estral regular, extendido y anormal en sus ciclos consecutivos se evaluó por medio de una prueba de χ^2 con una significancia de $p < 0.05$.

Para analizar la concentración sérica de estradiol se realizó una prueba t de Student para grupos independientes, con una significancia de $p < 0.05$.

Por último, la expresión de los RE α en útero y ovarios se analizó con una prueba t de Student para grupos independientes, con una significancia de $p < 0.05$.

3.2 RESULTADOS

A) Evaluación del ciclo estral

El efecto de la administración de CMI sobre el ciclo estral se muestra en la figura 7. El análisis estadístico reveló diferencias significativas ($t=4.661$, 17 gl, $p<0.0002$) en el número de ciclos que presentaron las ratas. El grupo CMI presentó menos ciclos (2.1 ± 0.1) respecto al grupo CTRL (3.1 ± 0.2) durante un periodo de 14 días.

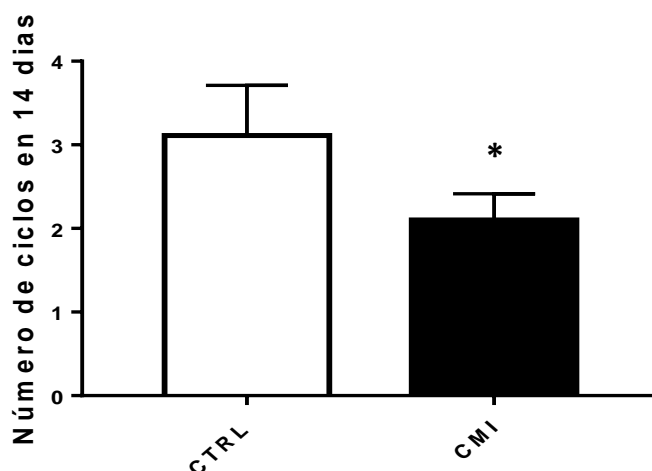
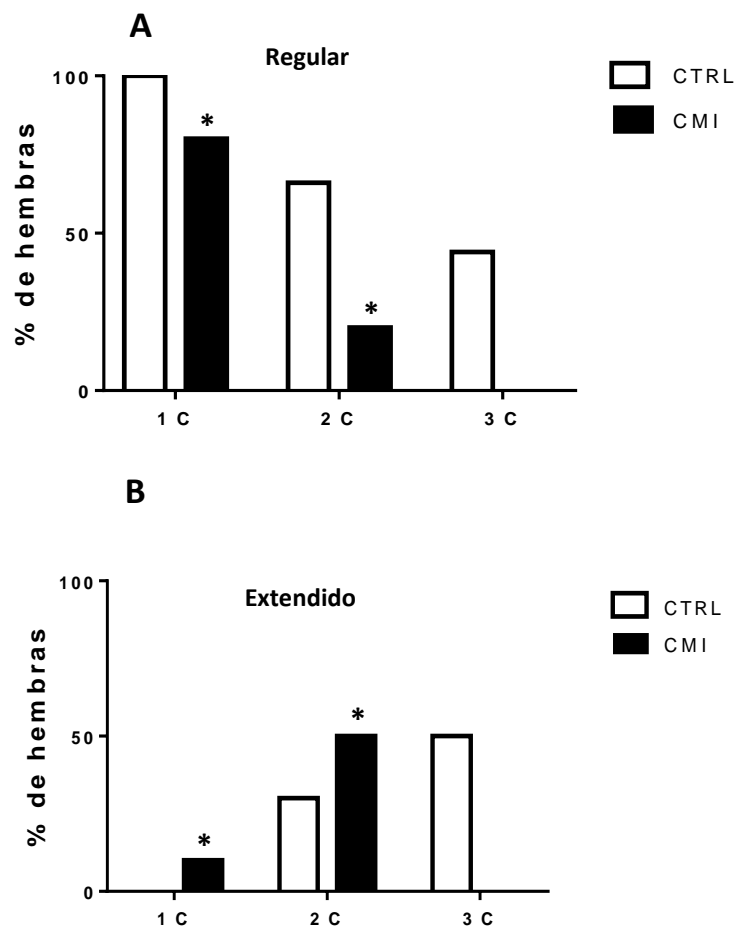


Figura 7. Número de ciclos estrales durante un periodo de 14 días en ratas tratadas neonatalmente con CMI. Las ratas CMI presentaron un menor número de ciclos estrales respecto al grupo CTRL. Media \pm E.E prueba t-Student. * $p<0.05$ comparado con el CTRL. CTRL: control, CMI: clomipramina.

La figura 8 muestra la proporción de hembras que presentaron ciclos normales, extendidos y anormales en sus ciclos consecutivos durante un periodo de 14 días de registro. Durante su primer ciclo estral el 80% de las hembras CMI presentaron ciclo normal (A), mientras que el 10% de ellas presentaron ciclo extendido (B) y el resto (10%) tuvieron ciclo anormal (C). En el caso de las hembras del grupo CTRL, el 100% tuvieron su primer ciclo normal ($X_i = 18.82$, $p < 0.0001$) (A). Durante su segundo ciclo, el 20% de las hembras CMI presentaron ciclo normal (A), ya que el 50% de ellas presentó ciclo extendido (B) y el 30% restante tuvieron ciclo anormal (C), respecto a las hembras control el 70% del grupo presentó su segundo ciclo normal (A), el 20% tuvieron ciclo extendido (B) y el 10% presentó ciclo anormal ($X_i = 63.44$, $p < 0.0001$) (C). Solo las hembras control presentaron un tercer ciclo (A).



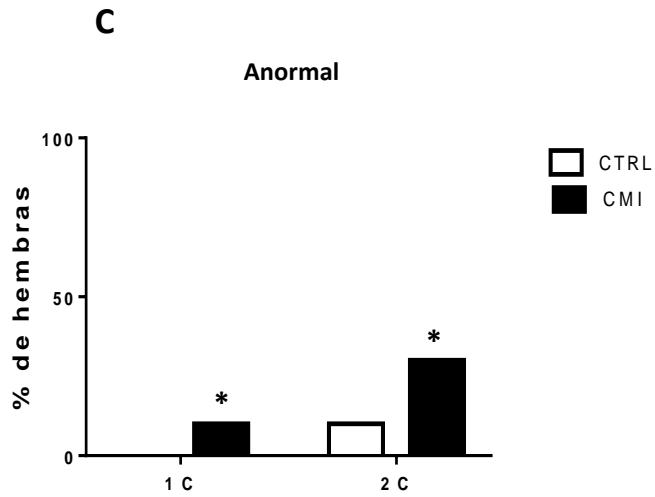


Figura 8. Tipo de ciclo estral que presentaron las hembras tratadas neonatalmente con CMI durante sus ciclos consecutivos (1C, 2C, 3C). Las ratas CMI presentaron menos ciclos estrales normales con una mayor ocurrencia de ciclos estrales extendidos y anormales. Xi cuadrada, * $p < 0.05$ comparado con el CTRL. CTRL: control, CMI: clomipramina.

B) Concentración de estradiol durante el ciclo estral

La figura 9 (panel A y B) muestra las concentraciones séricas de estradiol durante las fases de proestro-estro y metaestro-diestro en hembras del grupo CTRL, así como en hembras tratadas neonatalmente con CMI. El análisis estadístico mostró diferencias significativas entre los grupos en las fases de proestro-estro ($t=2.223$, 11 gl, $p=0.0482$), ya que el grupo CMI tuvo menor concentración de estradiol (19.79 ± 0.9503), respecto al grupo control (27.07 ± 3.384). Sin embargo, no se encontraron diferencias en las concentraciones séricas de estradiol en las fases de metaestro-diestro ($t=0.3071$, 10 gl, $p=0.7650$) entre el grupo de hembras CMI (19.33 ± 0.3333) y el grupo control (19.50 ± 0.4282).

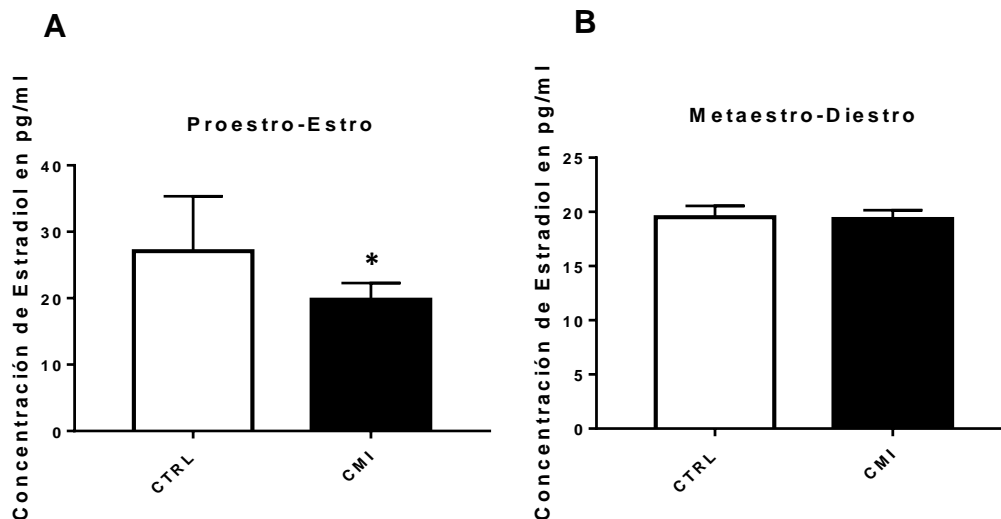


Figura 9. Concentración sérica de estradiol en las etapas proestro-estro (A) y metaestro-diestro (B). El tratamiento neonatal con CMI induce una disminución en la concentración sérica de estradiol en la etapa de proestro-estro. Media \pm E.E prueba t-Student. * $p < 0.05$ comparado con el CTRL. CTRL: control, CMI: clomipramina.

C) Evaluación de la expresión relativa de los RE α en los cuernos uterinos

La figura 10 muestra la expresión relativa del RE α en cuernos uterinos durante las fases de metaestro-diestro y proestro-estro de ambos grupos. El análisis estadístico mostró diferencias significativas en la etapa de metaestro-diestro ($t= 3.386$, 20 gl, $p= 0.0029$) el grupo de hembras CMI presentó una mayor expresión relativa de los RE α en los cuernos uterinos (282.8 ± 74.85) comparado con el grupo CTRL (27.3 ± 9.45) de manera similar, el análisis estadístico mostró diferencias significativas durante las fases de proestro-estro ($t=2.505$, 18 gl, $p=0.0221$), donde las hembras CMI también presentaron una mayor expresión relativa de los RE α en los cuernos uterinos (215.8 ± 61.2) respecto al grupo CTRL (39.11 ± 35.1).

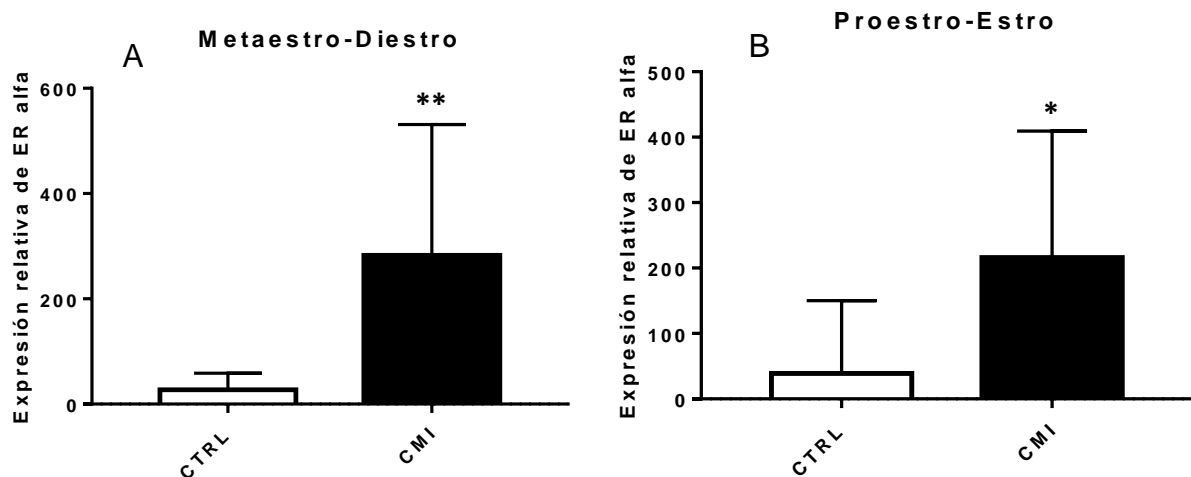


Figura 10. Expresión relativa de los RE α en cuernos uterinos durante las fases de metaestro-diestro (A) y proestro-diestro (B). Podemos observar que el tratamiento neonatal con CMI induce una mayor expresión de los RE α en los cuernos uterinos durante todas las fases del ciclo estral. Media \pm E.E prueba t-Student. * $p<0.05$ comparado con el CTRL. CTRL: control, CMI: clomipramina.

D) Evaluación de la expresión relativa de los RE α en los ovarios

La figura 11 muestra la expresión relativa de los RE α en ovarios durante las fases de metaestro-diestro y proestro-estro en hembras CTRL, así como en hembras tratadas neonatalmente con CMI. El análisis estadístico nos indica que durante las fases de metaestro-diestro no existen diferencias significativas en los RE α ($t=0.2638$, 18 gl, $p=0.7949$) en el grupo de hembras CMI (82.09 ± 53.82) comparado con el grupo CTRL (66.78 ± 21.69). Sin embargo, el grupo de hembras CMI durante las fases de proestro-estro disminuyó significativamente ($t=3.501$, 20 gl, $p=0.0022$) a expresión relativa de los RE α (67.78 ± 22.81) respecto al grupo CTRL (182.80 ± 23.64).

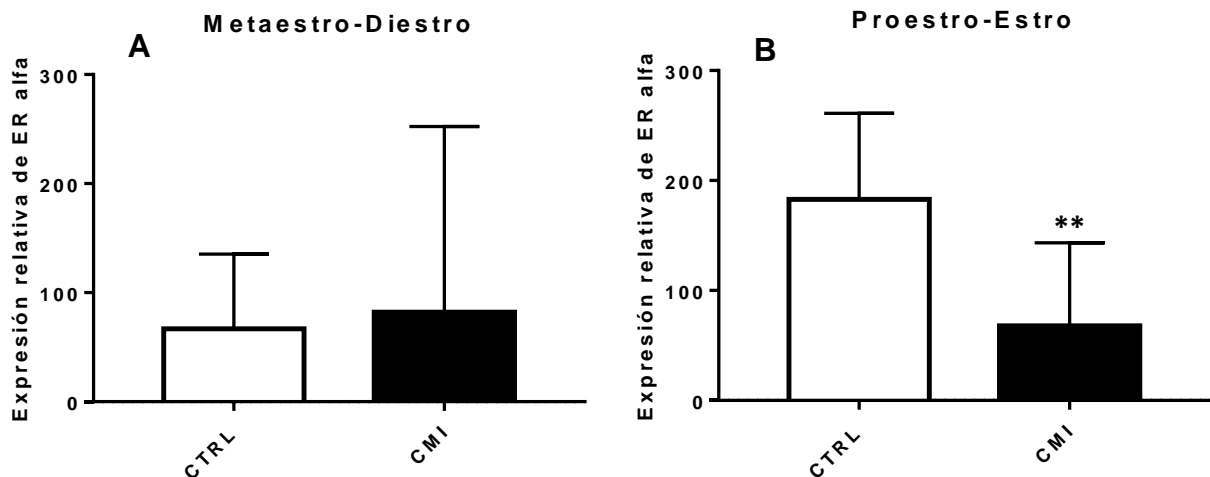


Figura 11. Expresión relativa de los RE α en ovarios durante las fases de metaestro-diestro (A) y Proestro-Diestro (B). Durante las fases de metaestro-diestro no se observaron diferencias para ambos grupos, sin embargo, durante las fases de proestro-estro las hembras CMI presentan una disminución de la expresión relativa de los RE α en los ovarios. Media \pm E.E prueba t-Student. * $p<0.05$ comparado con el CTRL. CTRL: control, CMI: clomipramina.

3.3 DISCUSIÓN

El uso de fármacos durante la gestación o lactancia induce alteraciones que afectan algunos parámetros reproductivos (Loughhead et al., 2006). En nuestros resultados encontramos que en ratas hembras adultas expuestas a CMI durante la etapa neonatal presentan un menor número de ciclos estrales, con mayor presencia de ciclos extendidos, una menor concentración de estradiol y una mayor expresión de RE α en el útero tanto en la etapa de P-E como en M-D y una disminución en la expresión de RE α en ovario en la etapa de P-E. Por lo tanto, nuestros hallazgos indican que la administración neonatal con CMI altera de manera importante la reproducción femenina.

La CMI como los ISRS, inhiben la recaptura de 5-HT, neurotransmisor que tiene diversas funciones, durante el neurodesarrollo, participa en la formación de circuitos que inervan distintas áreas cerebrales; mientras que durante la edad regula procesos fisiológicos como la reproducción (Döhler, 1991). También se sabe que es uno de los primeros neurotransmisores que aparecen en el (SNC) y se ha propuesto que actúa como una señal en la proliferación, diferenciación y apoptosis celular (Azmitia, 2001; Verney Lebrand, y Gaspar, 2002). De hecho, la génesis temprana de las neuronas monoaminérgicas en mamíferos es de gran importancia debido a su papel trófico sobre la morfogénesis cerebral, esto debido a la presencia de la 5-HT en etapas tempranas en las regiones cerebrales, por delante de otros neurotransmisores, además de regular el crecimiento interno y el desarrollo terminal de otras monoaminas, en particular de la dopamina (Lambe et al., 2000).

Por su parte se ha reportado que el tratamiento neonatal con CMI modifica la conducta sexual masculina (Bonilla-Jaime et al., 1998), sin cambios en las concentraciones de testosterona y estradiol (Limón-Morales et al., 2014a). Además, Molina-Jiménez y cols (2018) demostraron que el mismo tratamiento con CMI altera el ciclo estral, al inducir una reducción en el número de ciclos estrales, además de afectar la conducta sexual femenina. Un efecto contrario se observó con la

administración de fluoxetina durante el periodo de gestación y lactancia en ratas hembras, dicho tratamiento generó un aumento en la concentración de estradiol sin alterar el ciclo estral, ni la conducta sexual femenina. Sin embargo, indujo retrasó en el inicio de la pubertad con una disminución en la concentración de LH (dos Santos et al., 2016); por lo que se puede sugerir que la exposición de fármacos como la fluoxetina durante la gestación y la lactancia compromete algunos parámetros reproductivos en la descendencia de las ratas hembras tales como: el primer estro, así como la concentración de estradiol y LH (dos Santos et al., 2016). En conjunto estos datos muestran que tras modificar el sistema 5-HTérgico por efecto de fármacos como la CMI o fluoxetina durante el neurodesarrollo parece afectar la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en particular el ovárico y repercutir en los procesos reproductivos como el ciclo estral y la conducta sexual.

El eje HHO regula los procesos reproductivos tales como: la conducta sexual femenina, el ciclo estral y la esteroidogénesis. En el hipotálamo se lleva la síntesis y liberación de GnRH, hormona que tiene un papel fundamental en la regulación del control neuroendocrino en la reproducción. En la hipófisis la GnRH es la principal señal neural responsable de la síntesis y liberación de la LH y la FSH, las cuales ejercerán su efecto en el ovario, en el caso de la FSH inducirá la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa y la LH será la encargada de inducir la ovulación, así como estimular la síntesis de progesterona en las células de la teca (Smith y Jennes, 2001).

Existen evidencias, que en varios núcleos del hipotálamo, tales como el núcleo ventromedial (VMN), núcleo arcuato (NA), hipotálamo anterior y área preóptica (APO, estructura encargada de regular la secreción de GnRH, la conducta sexual femenina y el ciclo estral) reciben aferencias 5-HTérgicas provenientes del rafé dorsal y medial (Kanno et al., 2008a). Por otro lado, Pronina y cols. (2003) analizaron la participación de la 5-HT en el origen, diferenciación y migración de las neuronas GnRHérgicas, mediante la inhibición de la síntesis de 5-HT con p-clorofenilalanina (pCPA), a partir del día 11 hasta el 15, 17 y 20 días de gestación para evaluar los efectos sobre las alteraciones metabólicas en el

desarrollo del cerebro. En este sentido reportaron que el tratamiento con pCPA disminuye la concentración de 5-HT en un 50-70% en la región cráneo nasal y el cerebro anterior a cualquier edad estudiada. Además, disminuyó la migración de las neuronas GnRHérgicas de la placa olfatoria al hipotálamo, sugiriendo que actúa estimulando la migración de la neurona GnRH, y contribuye a la regulación del origen, diferenciación y migración de las neuronas GnRHérgicas (Pronina y cols. 2003). Sin embargo, la CMI induce un efecto contrario al pCPA, ya que aumenta la 5-HT en el espacio sináptico, lo cual podría modificar mecanismos de señalización de los receptores 5-HTérgicos o el transportador de 5-HT, que están relacionados con procesos de migración y proliferación en otros sistemas de neurotransmisión y de sinaptogénesis (Hansson et al., 1998).

Algunos estudios reportan que la administración de fármacos como los ISRS durante etapas tempranas influye en el sistema 5-HTérgico afectando el desarrollo del mismo. Ratas hembras adultas tratadas perinatalmente con fluoxetina mostraron un aumento en las concentraciones de 5-HT en la corteza prefrontal y en la corteza cingulada (Gemmell et al., 2018). Dicho efecto es dependiente del sexo, ya que existen evidencias que indican que las hembras expuestas a fluoxetina a partir del día 10 de gestación presentan concentraciones más altas de 5-HT en la corteza prefrontal respecto a los machos que estuvieron expuestos al mismo tratamiento. Por lo tanto, estos datos indican que las hembras son más vulnerables a sufrir cambios en las concentraciones de 5-HT mediante un incremento de este neurotransmisor en la corteza prefrontal, estructural cerebral que se encarga de regular algunos procesos como las emociones, la memoria y la atención (Gemmell et al., 2018).

Todo lo anterior sustenta que la modificación del sistema 5-HTérgico por inhibir su síntesis o inhibir el sistema de recaptura por la administración de CMI o fluoxetina, parece modificar la migración, proliferación y/o su función de las neuronas GnRH y por ende la actividad de la 5-HT sobre el eje HHO, circuito neuroendócrino que regula el ciclo estral.

Nuestros resultados indican que el tratamiento neonatal con CMI altera el ciclo estral, de tal forma que disminuye el número de ciclos estrales en las hembras CMI (2.1 ± 0.1) respecto al grupo CTRL (3.111 ± 0.2) durante un periodo de 14 días, observándose que una gran proporción de las hembras CMI presentaron ciclos estrales extendidos, los cuales se caracterizaron por la presencia de más días de diestro. Otro estudio reciente reporta que el tratamiento neonatal con CMI causa alteraciones en el ciclo estral, reduciendo los días de estro, además una gran proporción de las hembras CMI presentan al menos 1 ciclo extendido, así como una reducción en el número de ciclos estrales comparado con las hembras CTRL (Molina-Jiménez et al., 2018). De manera similar, la administración de clorhidrato de fluoxetina dos semanas antes de la gestación y hasta el día del destete a una dosis de 10mg/kg indujo ciclos irregulares, con mayor presencia de ciclos extendidos durante la edad adulta, que se caracterizaron por una fase de estro prolongada, y una mayor cantidad de células apoptóticas en el ovario, mostrando que los genes que regulan la señalización y acción de 5-HT en el ovario se alteran en las ratas expuestas a fluoxetina durante la etapa neonatal (Moore et al., 2015b). Este efecto parece depender de la dosis, ya que la administración de 5 mg/kg de fluoxetina durante la gestación y la lactancia no genera modificaciones en el ciclo estral (dos Santos et al., 2016).

Al respecto, el ciclo estral es regulado por el estradiol (Butcher et al., 1974), por lo que las alteraciones que se presentaron en el ciclo estral podría deberse a las bajas concentraciones de estradiol debido al tratamiento con CMI.

Si bien el ciclo estral está regulado por el eje HHO, la actividad de éste eje es antagonizada por el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal (HHA), se ha observado que ratas macho tratadas con CMI presentan hiperactividad en el eje HHA al incrementarse la concentración sérica de corticosterona (Prathiba et al., 1998; Bonilla Jaime et al, 2003), dicho glucocorticoide causa un efecto inhibitorio sobre el eje HPG al inhibir las funciones reproductivas (Geraghty y Kaufer, 2015). Por ejemplo, a través de la activación de los receptores de la hormona liberadora de corticotropina (CRH) y glucocorticoides que se expresan en neuronas GnRH, se inhibe la síntesis y liberación de GnRH (Calogero et al., 1999; Bowe et al., 2008;

Whirledge y Cidlowski, 2010). Además, concentraciones elevadas de CRH inhiben el pico de LH (Cates et al., 2004; Breen et al., 2012), mientras que un aumento de corticosterona inhibe la síntesis de testosterona, estradiol y progesterona (Whirledge y Cidlowski, 2010; Geraghty y Kaufer, 2015). Aunque los glucocorticoides son necesarios para el desarrollo folicular, las concentraciones altas pueden conducir a una disfunción ovárica (Dorfman et al., 2003; Geraghty y Kaufer, 2015).

Por otro lado, la 5-HT ejerce sus funciones a través de la interacción con sus diferentes tipos de receptores ubicados en diversas áreas del cerebro. En el hipotálamo existe la presencia de receptores 5-HT1A, 5-HT2A/C y 5-HT7. Sin embargo, los receptores ejercen su efecto de manera diferencial dependiendo del género y la edad (Wang et al., 2016). En el caso de las ratas hembras los receptores 5HT1A, 5-HT2A/C y 5-HT7 son los encargados de regular los procesos reproductivos a través del eje hipotálamo-hipófisis- ovario (Wang et al., 2016). En ratas adultas, la 5-HT tiene acción bimodal al interactuar con sus receptores 5-HT1A y 2-HT2C, en el área preóptica se libera la LH para llevarse a cabo la ovulación, mientras que en el hipotálamo mediobasal (MBH) es inhibida (Kordon y Glowinski, 1972). Al respecto, se ha demostrado que la microinyección de metiotepina (antagonista del receptor 5HT1A) en el APOm induce un incremento de LH, sin modificar las concentraciones de FSH en ratas ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Johnson y Kitts, 1988). Mientras, la microinyección de ketanserina (antagonista del receptor 5-HT2C) en el APOm reduce las concentraciones de LH y FSH en plasma en los animales sometidos al mismo tratamiento esteroideo, efecto que es revertido mediante la administración de estrógenos (Johnson y Kitts, 1988).

Respecto a los receptores 5-HTérgicos, en machos se ha reportado que el tratamiento neonatal con CMI induce una regulación negativa del ARNm de los autorreceptores 5-HT1A en el rafé dorsal, y un incremento en la expresión de los receptores postsinápticos 5-HT1A en el hipocampo e hipotálamo (Limón-Morales et al., 2014c), por lo que cabe la posibilidad, que la expresión de los receptores 5-HTérgicos 5-HT1A y 5-HT2C esté alterada por efecto del tratamiento neonatal de CMI, y por lo tanto, la alteración de dichos receptores genere un déficit en la

concentración de LH y FSH con una repercusión en la disminución en la síntesis de estrógenos (Gouveia y Franci, 2004), además de inducir anomalías en el ciclo estral y la conducta sexual femenina (Molina et al, 2018).

Los estrógenos tienen como función regular el ciclo estral e inducir cambios cíclicos en la morfología celular e histología del epitelio uterino de la rata (Spornitz et al., 1994). Durante el ciclo estral, las concentraciones de estrógenos varían dependiendo de la fase del ciclo estral. En este sentido, el tratamiento con CMI disminuyó la concentración de estrógenos en las hembras durante las fases de proestro-estro respecto al grupo CTRL, sin efecto en las fases de metaestro-diestro. Se ha reportado un efecto contrario en hembras tratadas con 5 mg/kg fluoxetina durante la gestación y la lactancia, es decir un incremento en la concentración de estradiol (dos Santos et al., 2016). Sin embargo, otro estudio reporta que la administración de 10 mg/kg de fluoxetina durante la gestación y la lactancia por vía intragástrica no afecta la concentración de estradiol (Moore et al., 2015b).

En conjunto, estos datos respaldan la hipótesis de que la interrupción del ciclo estral puede deberse a una disminución de las concentraciones de estrógenos por efecto del tratamiento neonatal con CMI que altera el eje HHO, que pudiera ser causada por un aumento prolongado de glucocorticoides producidos por una hiperactividad del eje HHA (Whirlledge y Cidlowski, 2010) y/o modificaciones en los receptores 5-HTérgicos que regulan la liberación de GnRH y en consecuencia de LH y FSH, en las estructuras cerebrales implicadas en la reproducción como el hipotálamo.

Los estrógenos ejercen su función mediante la unión a sus receptores específicos en las células diana, lo que conduce a la activación transcripcional de los genes que responden a los esteroides y, posteriormente, a una modificación de las respuestas celulares. En el aparato reproductor femenino de la rata los RE α son el subtipo de receptor dominante en el útero, el oviducto, el cuello uterino y la vagina, con una distribución variable en el estroma y el epitelio durante el ciclo estral. (Wang et al., 2000a). No obstante, la expresión relativa de los niveles del RE α que se localizan en el útero y los ovarios varía de acuerdo a la fase del ciclo estral en que

se encuentre la hembra. La expresión relativa de dichos receptores es más alta durante la etapa de proestro, habiendo un decremento de la expresión de estos receptores durante la etapa de estro, sin embargo la expresión relativa de los RE α es más baja durante el metaestro, mientras que en el diestro dicha expresión comienza aumentar ligeramente (Wang et al., 2000b).

El tratamiento neonatal con CMI modificó la expresión relativa del RE α que se localiza en los cuernos uterinos, dichos receptores presentaron un aumento en su expresión durante las fases de proestro- estro y metaestro- diestro, mientras que en ovario la expresión de los RE α disminuyó en las fases de proestro-estro sin mostrar cambios en las fases de metaestro-diestro. Un efecto similar se observó por efecto del tratamiento neonatal con fluoxetina; en los ovarios la expresión de los RE α disminuyó durante las fases de proestro-estro y metaestro-diestro (Moore et al., 2015b). En este sentido, se ha reportado que la 5-HT juega un papel inhibitorio en la expresión de los RE α que se encuentran en los núcleos hipotalámicos periventricular anteroventral, ventromedial anteroventral y el núcleo arcuato (Ito et al., 2014). En el caso del núcleo ventromedial anteroventral, el RE α juega un papel crítico, ya que induce la liberación de GnRH en respuesta a los estrógenos durante la fase folicular (Wiegand y Terasawa, 1982), por lo que la regulación de la expresión del RE α en el núcleo anteroventral es importante en los mecanismos inductores de la ovulación (Yamada et al., 2009), por lo tanto, la alteración en la expresión del RE α podría desregular la función del eje HHO y en consecuencia inhibir la síntesis de estrógenos y por lo tanto generar alteraciones en el ciclo estral.

Por otra parte, existe la evidencia de la presencia de 5-HT en las células de la granulosa y del cúmulo; así como, del transportador de 5-HT en la membrana del ovocito y de la enzima triptófano hidroxilasa en las células foliculares, sugiriendo que ambos componentes pueden actuar localmente y regular procesos como la esteroidogénesis y la maduración ovárica (Dubé y Amireault, 2007; Nikishin et al., 2018). Por lo que cabe la posibilidad que el tratamiento con algunos fármacos que actúan a nivel de SNC como los ISRS, pueden modificar la dinámica de los folículos ováricos y por consecuencia la actividad del RE α (Moore et al., 2015c) podría estar desregulada.

3.4 CONCLUSIÓN

El tratamiento neonatal con clomipramina en ratas hembras afecta el ciclo estral induciendo una mayor proporción de hembras que presentaron ciclos extendidos, los cuales se caracterizaron por la presencia de más días de diestro, dicho efecto puede deberse a la baja concentración de estradiol en la etapa de proestro-estro y/o por una modificación de la expresión relativa del RE α en los cuernos uterinos durante las fases del ciclo estral, así como en los ovarios, donde se observó una disminución de la expresión de los RE α durante las fases de proestro-estro.

El jurado designado por la Comisión Académica del Posgrado en Biología de la Reproducción Animal de la división de Ciencias Biológicas y de la Salud de la Universidad Autónoma Metropolitana aprobó la Tesis titulada: "Ciclo estral, concentración de estradiol y receptores a estrógenos alfa (RE α) en útero y ovarios de la rata tratada neonatalmente con clomipramina (CMI)", que presentó la alumna: Yumara Lee Pérez Bautista, el día 06 de diciembre del año 2018.

Sinodales:

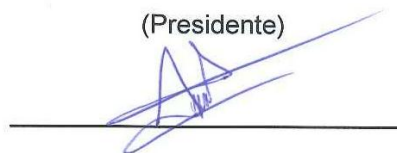
Dra. Tania Molina Jiménez

Profesor

Facultad de Biología y Facultad de Q.F.B

Universidad Veracruzana.

(Presidente)



Dr. César Soria Fregozo

Profesor Investigador

Departamento de Ciencias de la Tierra y de la Vida.

Centro Universitario de los Lagos,

Universidad de Guadalajara.

(Secretario)



Dra. Albertina Cortés Sol

Profesor Investigador

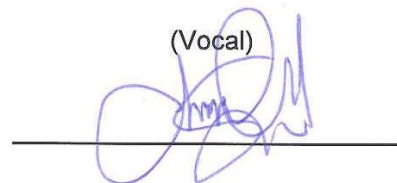
Departamento de Biología y Ecología del

Comportamiento.

Facultad de Biología Región Xalapa,

Universidad Veracruzana.

(Vocal)



Dra. María del Rosario Tarragó Castellanos

Profesor Investigador

Departamento de Biología de la Reproducción,

División de Ciencias Biológicas y de la Salud.

Universidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa.

(Vocal)





Casa abierta al tiempo

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

ACTA DE EXAMEN DE GRADO

No. 00063

Matrícula: 2163801859

**CICLO ESTRAL,
CONCENTRACIÓN DE
ESTRADIOL Y RECEPTORES A
ESTRÓGENOS ALFA (REα) EN
ÚTERO Y OVARIOS DE LA RATA
TRATADA NEONATALMENTE
CON CLOMIPRAMINA (CMI)**

En la Ciudad de México, se presentaron a las 11:00 horas del día 6 del mes de diciembre del año 2018 en la Unidad Iztapalapa de la Universidad Autónoma Metropolitana, los suscritos miembros del jurado:

DRA. TANIA MOLINA JIMENEZ
DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO CASTELLANOS
DRA. ALBERTINA CORTES SOL
DR. CESAR SORIA FREGOSO



YUMARA LEE PEREZ BAUTISTA
ALUMNA

Bajo la Presidencia de la primera y con carácter de Secretario el último, se reunieron para proceder al Examen de Grado cuya denominación aparece al margen, para la obtención del grado de:

MAESTRA EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION ANIMAL

DE: YUMARA LEE PEREZ BAUTISTA

y de acuerdo con el artículo 78 fracción III del Reglamento de Estudios Superiores de la Universidad Autónoma Metropolitana, los miembros del jurado resolvieron:

Aprobar

REVISOR

DR. JOSE ANTONIO DE LOS REYES HEREDIA
SECRETARIO GENERAL

Acto continuo, la presidenta del jurado comunicó a la interesada el resultado de la evaluación y, en caso aprobatorio, le fue tomada la protesta.

DIRECTORA DE LA DIVISIÓN DE CBS

DRA. SARA LUCIA CAMARGO RICALDE

PRESIDENTA

DRA. TANIA MOLINA JIMENEZ

VOCAL

DRA. MARIA DEL ROSARIO TARRAGO
CASTELLANOS

VOCAL

DRA. ALBERTINA CORTES SOL

SECRETARIO

DR. CESAR SORIA FREGOSO

3.5 BIBLIOGRAFÍA

Amenta, F., Vega, J.A., Ricci, A., and Collier, W.L. (1992). Localization of 5-hydroxytryptamine-like immunoreactive cells and nerve fibers in the rat female reproductive system. *The Anatomical Record* 233, 478–484.

Amireault, P., and Dubé, F. (2005). Serotonin and its antidepressant-sensitive transport in mouse cumulus-oocyte complexes and early embryos. *Biol. Reprod.* 73, 358–365.

Anand, K.J.S., and Scalzo, F.M. (2000). Can Adverse Neonatal Experiences Alter Brain Development and Subsequent Behavior? *Neonatology* 77, 69–82.

Andersen, S.L., Dumont, N.L., and Teicher, M.H. (2002). Differences in behavior and monoamine laterality following neonatal clomipramine treatment. *Developmental Psychobiology* 41, 50–57.

Azmitia, E.C. (2001). Modern views on an ancient chemical: serotonin effects on cell proliferation, maturation, and apoptosis. *Brain Res. Bull.* 56, 413–424.

Bakker, J., Pool, C.W., Sonnemans, M., van Leeuwen, F.W., and Slob, A.K. (1997). Quantitative estimation of estrogen and androgen receptor-immunoreactive cells in the forebrain of neonatally estrogen-deprived male rats. *Neuroscience* 77, 911–919.

Belik, J. (2008). Fetal and Neonatal Effects of Maternal Drug Treatment for Depression. *Seminars in Perinatology* 32, 350–354.

Benes, F.M., Taylor, J.B., and Cunningham, M.C. (2000). Convergence and plasticity of monoaminergic systems in the medial prefrontal cortex during the postnatal period: implications for the development of psychopathology. *Cereb. Cortex* 10, 1014–1027.

Bondesson, M., Hao, R., Lin, C.-Y., Williams, C., and Gustafsson, J.-Å. (2015). Estrogen receptor signaling during vertebrate development. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1849, 142–151.

Bonilla-Jaime, H., Retana-Marquez, S., and Velazquez-Moctezuma, J. (1998). Pharmacological features of masculine sexual behavior in an animal model of depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 60, 39–45.

Bonilla-Jaime, H., Retana-Márquez, S., Vazquez-Palacios, G., and Velázquez-Moctezuma, J. (2003). Plasma levels of corticosterone and testosterone after sexual activity in male rats treated neonatally with clomipramine. *Behav Pharmacol* 14, 357–362.

Bonthuis, P.J., Cox, K.H., Searcy, B.T., Kumar, P., Tobet, S., and Rissman, E.F. (2010). Of mice and rats: Key species variations in the sexual differentiation of brain and behavior. *Frontiers in Neuroendocrinology* 31, 341–358.

Bowe, J.E., Li, X.F., Kinsey-Jones, J.S., Brain, S.D., Lightman, S.L., and O'Byrne, K.T. (2008). The role of corticotrophin-releasing hormone receptors in the calcitonin gene-related peptide-induced suppression of pulsatile luteinising hormone secretion in the female rat. *Stress* 11, 312–319.

Breen, K.M., Thackray, V.G., Hsu, T., Mak-McCully, R.A., Coss, D., and Mellon, P.L. (2012). Stress levels of glucocorticoids inhibit LH β -subunit gene expression in gonadotrope cells. *Mol. Endocrinol.* 26, 1716–1731.

Bromiker, R., and Kaplan, M. (1994). Apparent intrauterine fetal withdrawal from clomipramine hydrochloride. *JAMA* 272, 1722–1723.

Butcher, R.L., Collins, W.E., and Fugo, N.W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, prolactin, progesterone and estradiol-17 β throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology* 94, 1704–1708.

Calizo, L.H., and Flanagan-Cato, L.M. (2000). Estrogen selectively regulates spine density within the dendritic arbor of rat ventromedial hypothalamic neurons. *J. Neurosci.* 20, 1589–1596.

Calogero, A.E., Burrello, N., Bosboom, A.M.J., Garofalo, M.R., Weber, R.F.A., and D'Agata, R. (1999). Glucocorticoids inhibit gonadotropin-releasing hormone by acting directly at the hypothalamic level. *Journal of Endocrinological Investigation* 22, 666–670.

Campbell, R.E., and Herbison, A.E. (2007). Definition of brainstem afferents to gonadotropin-releasing hormone neurons in the mouse using conditional viral tract tracing. *Endocrinology* 148, 5884–5890.

Cates, P.S., Li, X.F., and O'Byrne, K.T. (2004). The Influence of 17 β -oestradiol on Corticotrophin-releasing Hormone Induced Suppression of Luteinising Hormone Pulses and the Role of CRH in Hypoglycaemic Stress-induced Suppression of Pulsatile LH Secretion in the Female Rat. *Stress* 7, 113–118.

Chandrasekar, G., Archer, A., Gustafsson, J.-Å., and Andersson Lendahl, M. (2010). Levels of 17 β -Estradiol Receptors Expressed in Embryonic and Adult Zebrafish Following In Vivo Treatment of Natural or Synthetic Ligands. *PLoS ONE* 5, e9678.

Chaouloff, F., Berton, O., and Mormède, P. (1999). Serotonin and stress. *Neuropsychopharmacology* 21, 28S-32S.

Clausell, D.E., and Soliman, K.F. (1978). Ovarian serotonin content in relation to ovulation. *Experientia* 34, 410–411.

Deave, T., Heron, J., Evans, J., and Emond, A. (2008). The impact of maternal depression in pregnancy on early child development. *BJOG: An International Journal of Obstetrics & Gynaecology* 115, 1043–1051.

Döhler, K.D. (1991). The pre- and postnatal influence of hormones and neurotransmitters on sexual differentiation of the mammalian hypothalamus. *Int. Rev. Cytol.* 131, 1–57.

Dorfman, M., Arancibia, S., Fiedler, J.L., and Lara, H.E. (2003). Chronic intermittent cold stress activates ovarian sympathetic nerves and modifies ovarian follicular development in the rat. *Biol. Reprod.* 68, 2038–2043.

Dworatzek, E., and Mahmoodzadeh, S. (2017). Targeted basic research to highlight the role of estrogen and estrogen receptors in the cardiovascular system. *Pharmacological Research* 119, 27–35.

Faber, K.M., and Haring, J.H. (1999). Synaptogenesis in the postnatal rat fascia dentata is influenced by 5-HT_{1a} receptor activation. *Developmental Brain Research* 114, 245–252.

Feng, P., Ma, Y., and Vogel, G.W. (2001). The critical window of brain development from susceptible to insusceptive. Effects of clomipramine neonatal treatment on sexual behavior. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 129, 107–110.

Fink, G. (1979). Feedback actions of target hormones on hypothalamus and pituitary with special reference to gonadal steroids. *Annu. Rev. Physiol.* 41, 571–585.

Fusani, L., and Gahr, M. (2006). Hormonal influence on song structure and organization: The role of estrogen. *Neuroscience* 138, 939–946.

Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003a). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nature Reviews Neuroscience* 4, 1002–1012.

Gaspar, P., Cases, O., and Maroteaux, L. (2003b). The developmental role of serotonin: news from mouse molecular genetics. *Nat. Rev. Neurosci.* 4, 1002–1012.

Geraghty, A.C., and Kaufer, D. (2015). Glucocorticoid Regulation of Reproduction. *Adv. Exp. Med. Biol.* 872, 253–278.

Goldman, J.M., Murr, A.S., and Cooper, R.L. (2007a). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 80, 84–97.

Goldman, J.M., Murr, A.S., and Cooper, R.L. (2007b). The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology* 80, 84–97.

Gouveia, E.M., and Franci, C.R. (2004). Involvement of serotonin 5HT1 and 5HT2 receptors and nitric oxide synthase in the medial preoptic area on gonadotropin secretion. *Brain Res. Bull.* 63, 243–251.

Gundlah, C., Alves, S.E., Clark, J.A., Pai, L.-Y., Schaeffer, J.M., and Rohrer, S.P. (2005). Estrogen receptor- β regulates tryptophan hydroxylase-1 expression in the murine midbrain raphe. *Biological Psychiatry* 57, 938–942.

Hansson, S.R., Mezey, E., and Hoffman, B.J. (1998). Serotonin transporter messenger RNA in the developing rat brain: early expression in serotonergic neurons and transient expression in non-serotonergic neurons. *Neuroscience* 83, 1185–1201.

Hay, D.F., Pawlby, S., Waters, C.S., and Sharp, D. (2008). Antepartum and postpartum exposure to maternal depression: different effects on different adolescent outcomes. *Journal of Child Psychology and Psychiatry* 49, 1079–1088.

Homberg, J.R., and Lesch, K.-P. (2011). Looking on the Bright Side of Serotonin Transporter Gene Variation. *Biological Psychiatry* 69, 513–519.

Homberg, J.R., Schubert, D., and Gaspar, P. (2010). New perspectives on the neurodevelopmental effects of SSRIs. *Trends in Pharmacological Sciences* 31, 60–65.

Huttenlocher, P.R., and Dabholkar, A.S. (1997). Regional differences in synaptogenesis in human cerebral cortex. *J. Comp. Neurol.* 387, 167–178.

Judd, F.K., Chua, P., Lynch, C., and Norman, T. (1991). Fenfluramine Augmentation of Clomipramine Treatment of Obsessive Compulsive Disorder. *Australian & New Zealand Journal of Psychiatry* 25, 412–414.

Kanno, K., Shima, S., Ishida, Y., and Yamanouchi, K. (2008). Ipsilateral and contralateral serotonergic projections from dorsal and median raphe nuclei to the forebrain in rats: Immunofluorescence quantitative analysis. *Neuroscience Research* 61, 207–218.

Kieler, H., Artama, M., Engeland, A., Ericsson, O., Furu, K., Gissler, M., Nielsen, R.B., Nørgaard, M., Stephansson, O., Valdimarsdottir, U., et al. (2012). Selective serotonin reuptake inhibitors during pregnancy and risk of persistent pulmonary hypertension in the newborn: population based cohort study from the five Nordic countries. *BMJ* 344, d8012.

Kim, J.-W., Ahn, H.-S., Baik, J.-H., and Yoon, B.-J. (2013). Administration of clomipramine to neonatal mice alters stress response behavior and serotonergic gene expressions in adult mice. *Journal of Psychopharmacology* 27, 171–180.

Lambe, E.K., Krimer, L.S., and Goldman-Rakic, P.S. (2000). Differential postnatal development of catecholamine and serotonin inputs to identified neurons in prefrontal cortex of rhesus monkey. *J. Neurosci.* 20, 8780–8787.

Lauder, J.M., and Krebs, H. (1976). Effects of p-chlorophenylalanine on time of neuronal origin during embryogenesis in the rat. *Brain Research* 107, 638–644.

Liao, C.-C., and Lee, L.-J. (2011). Neonatal fluoxetine exposure affects the action potential properties and dendritic development in cortical subplate neurons of rats. *Toxicology Letters* 207, 314–321.

Loughhead, A.M., Fisher, A.D., Newport, D.J., Ritchie, J.C., Owens, M.J., DeVane, C.L., and Stowe, Z.N. (2006). Antidepressants in amniotic fluid: another route of fetal exposure. *Am J Psychiatry* 163, 145–147.

Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., and Tanno, A.P. (2002a). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62, 609–614.

Marcondes, F.K., Bianchi, F.J., and Tanno, A.P. (2002b). Determination of the estrous cycle phases of rats: some helpful considerations. *Braz J Biol* 62, 609–614.

Marcus, S.M., Flynn, H.A., Blow, F.C., and Barry, K.L. (2003). Depressive symptoms among pregnant women screened in obstetrics settings. *J Womens Health (Larchmt)* 12, 373–380.

Millan, M., Marin, P., Bockaert, J., and Mannourylacour, C. (2008). Signaling at G-protein-coupled serotonin receptors: recent advances and future research directions. *Trends in Pharmacological Sciences* 29, 454–464.

Molina-Jiménez, T., Landa-Cadena, L., and Bonilla-Jaime, H. (2017). Chronic treatment with estradiol restores depressive-like behaviors in female Wistar rats treated neonatally with clomipramine. *Hormones and Behavior* 94, 61–68.

Molina-Jiménez, T., Limón-Morales, O., and Bonilla-Jaime, H. (2018). Early postnatal treatment with clomipramine induces female sexual behavior and estrous cycle impairment. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 166, 27–34.

Moore, C.J., DeLong, N.E., Chan, K.A., Holloway, A.C., Petrik, J.J., and Sloboda, D.M. (2015a). Perinatal Administration of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Induces Impairments in Reproductive Function and Follicular Dynamics in Female Rat Offspring. *Reproductive Sciences* 22, 1297–1311.

Moore, C.J., DeLong, N.E., Chan, K.A., Holloway, A.C., Petrik, J.J., and Sloboda, D.M. (2015b). Perinatal Administration of a Selective Serotonin Reuptake Inhibitor Induces Impairments in Reproductive Function and Follicular Dynamics in Female Rat Offspring. *Reproductive Sciences* 22, 1297–1311.

Norrholm, S.D., and Ouimet, C.C. (2000). Chronic fluoxetine administration to juvenile rats prevents age-associated dendritic spine proliferation in hippocampus. *Brain Research* 883, 205–215.

Nulman, I., Rovet, J., Stewart, D.E., Wolpin, J., Pace-Asciak, P., Shuhaiber, S., and Koren, G. (2002). Child Development Following Exposure to Tricyclic Antidepressants or Fluoxetine Throughout Fetal Life: A Prospective, Controlled Study. *American Journal of Psychiatry* 159, 1889–1895.

Oberlander, T.F., Warburton, W., Misri, S., Aghajanian, J., and Hertzman, C. (2006). Neonatal outcomes after prenatal exposure to selective serotonin reuptake inhibitor antidepressants and maternal depression using population-based linked health data. *Arch. Gen. Psychiatry* 63, 898–906.

Octavio Villanueva Sanchez, and Rafael Hernandez Gonzalez (2004). *Manual de ciencias de los animales de laboratorio (Vazco de Quiroga)*.

Olivier, B., Chan, J.S.W., Snoeren, E.M., Olivier, J.D.A., Veening, J.G., Vinkers, C.H., Waldinger, M.D., and Oosting, R.S. (2010). Differences in Sexual Behaviour in Male and Female Rodents: Role of Serotonin. In *Biological Basis of Sex Differences in Psychopharmacology*, J.C. Neill, and J. Kulkarni, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg), pp. 15–36.

Pagano, G., Niccolini, F., Fusar-Poli, P., and Politis, M. (2017). Serotonin transporter in Parkinson's disease: A meta-analysis of positron emission tomography studies: SERT in Parkinson's Disease. *Annals of Neurology* 81, 171–180.

Pawluski, J.L., Galea, L.A.M., Brain, U., Papsdorf, M., and Oberlander, T.F. (2009). Neonatal S100B Protein Levels After Prenatal Exposure to Selective Serotonin Reuptake Inhibitors. *PEDIATRICS* 124, e662–e670.

Prasad, P., Ogawa, S., and Parhar, I.S. (2015). Role of serotonin in fish reproduction. *Frontiers in Neuroscience* 9.

Prathiba, J., Kumar, K.B., and Karanth, K.S. (1998). Hyperactivity of hypothalamic pituitary axis in neonatal clomipramine model of depression. *Journal of Neural Transmission* 105, 1335–1339.

Pronina, T., Ugrumov, M., Adamskaya, E., Kuznetsova, T., Shishkina, I., Babichev, V., Calas, A., Tramu, G., Mailly, P., and Makarenko, I. (2003). Influence of serotonin on the development and migration of gonadotropin-releasing hormone neurones in rat fetuses. *J. Neuroendocrinol.* 15, 549–558.

Puerta, and Lopez (2005). *Los esteroides sexuales femeninos y el equilibrio energético*.

Rayen, I., Steinbusch, H.W.M., Charlier, T.D., and Pawluski, J.L. (2014). Developmental fluoxetine exposure facilitates sexual behavior in female offspring. *Psychopharmacology* 231, 123–133.

Rehavi, M., Attali, G., Gil-Ad, I., and Weizman, A. (2000). Suppression of serum gonadal steroids in rats by chronic treatment with dopamine and serotonin reuptake inhibitors. *Eur Neuropsychopharmacol* 10, 145–150.

Rice, D., and Barone, S. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ. Health Perspect.* 108 Suppl 3, 511–533.

Richard, J.E., López-Ferreras, L., Anderberg, R.H., Olandersson, K., and Skibicka, K.P. (2017). Estradiol is a critical regulator of food-reward behavior. *Psychoneuroendocrinology* 78, 193–202.

Riveros-Barrera, I., and Dueñas, Z. (2015). La separación materna durante la lactancia altera los niveles basales neuroendocrinos en ratas adolescentes y adultas. *Biomédica* 36.

Rochira, V., Balestrieri, A., Madeo, B., Zirilli, L., Granata, A.R.M., and Carani, C. (2005). Bone loss, sex steroids and male age related hypogonadism. *J. Endocrinol. Invest.* 28, 46–48.

Romero-Reyes, J., Cárdenas, M., Damián-Matsumura, P., Domínguez, R., and Ayala, M.E. (2016). Inhibition of serotonin reuptake in the prepubertal rat ovary by fluoxetine and effects on ovarian functions. *Reproductive Toxicology* 59, 80–88.

Rubenstein, J.L. (1998). Development of serotonergic neurons and their projections. *Biol. Psychiatry* 44, 145–150.

Scharfman, H.E., and MacLusky, N.J. (2006). The Influence of Gonadal Hormones on Neuronal Excitability, Seizures, and Epilepsy in the Female. *Epilepsia* 47, 1423–1440.

Sharma, G., Mauvais-Jarvis, F., and Prossnitz, E.R. (2017). Roles of G protein-coupled estrogen receptor GPER in metabolic regulation. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*.

Smith, M.J., and Jennes, L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction* 122, 1–10.

Sodhi, M.S., and Sanders-Bush, E. (2004). Serotonin and brain development. In *International Review of Neurobiology*, (Elsevier), pp. 111–174.

Spencer, J.P., Gonzalez, L.S., and Barnhart, D.J. (2001). Medications in the breast-feeding mother. *Am Fam Physician* 64, 119–126.

Sundström, E., Kölare, S., Souverbic, F., Samuelsson, E.-B., Pschera, H., Lunell, N.-O., and Seiger, Å. (1993). Neurochemical differentiation of human bulbospinal monoaminergic neurons during the first trimester. *Developmental Brain Research* 75, 1–12.

Takahashi, H., Nakashima, S., Ohama, E., Takeda, S., and Ikuta, F. (1986). Distribution of serotonin-containing cell bodies in the brainstem of the human fetus determined with immunohistochemistry using antiserotonin serum. *Brain and Development* 8, 355–365.

Tanaka, E., Baba, N., Toshida, K., and Suzuki, K. (1993). Evidence for 5-HT₂ receptor involvement in the stimulation of preovulatory LH and prolactin release and ovulation in normal cycling rats. *Life Sci.* 52, 669–676.

Verney, C., Lebrand, C., and Gaspar, P. (2002). Changing distribution of monoaminergic markers in the developing human cerebral cortex with special emphasis on the serotonin transporter. *The Anatomical Record* 267, 87–93.

Vijayakumar, M., and Meti, B.L. (1999). Alterations in the levels of monoamines in discrete brain regions of clomipramine-induced animal model of endogenous depression. *Neurochem. Res.* 24, 345–349.

Vitale, M.L., and Chiochio, S.R. (1993). Serotonin, a neurotransmitter involved in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocr. Rev.* 14, 480–493.

Vogel, G., Hartley, P., Neill, D., Hagler, M., and Kors, D. (1988). Animal depression model by neonatal clomipramine: reduction of shock induced aggression. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 31, 103–106.

Wada, K., Hu, L., Mores, N., Navarro, C.E., Fuda, H., Krsmanovic, L.Z., and Catt, K.J. (2006). Serotonin (5-HT) receptor subtypes mediate specific modes of 5-HT-induced signaling and regulation of neurosecretion in gonadotropin-releasing hormone neurons. *Mol. Endocrinol.* 20, 125–135.

Wallace, J.A., and Lauder, J.M. (1983). Development of the serotonergic system in the rat embryo: an immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.* 10, 459–479.

Ward, R.K., and Zamorski, M.A. (2002). Benefits and risks of psychiatric medications during pregnancy. *Am Fam Physician* 66, 629–636.

Whirledge, S., and Cidlowski, J.A. (2010). Glucocorticoids, stress, and fertility. *Minerva Endocrinol.* 35, 109–125.

Whitaker-Azmitia, P.M. (2001). Serotonin and brain development: role in human developmental diseases. *Brain Res. Bull.* 56, 479–485.

Zha, W., Ho, H.T.B., Hu, T., Hebert, M.F., and Wang, J. (2017). Serotonin transporter deficiency drives estrogen-dependent obesity and glucose intolerance. *Scientific Reports* 7.

Zheng, P. (2009). Neuroactive steroid regulation of neurotransmitter release in the CNS: Action, mechanism and possible significance. *Progress in Neurobiology* 89, 134–152.