

La expresión del receptor de serotonina 7 en el Núcleo Paraventricular del Hipotálamo asociada a la neurotransmisión serotoninérgica durante el ciclo estral de la rata.

LFT. Kenny  
Alejandra Ruiz  
García

2023



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo



La expresión del receptor de serotonina 7 en el Núcleo Paraventricular del Hipotálamo asociada a la neurotransmisión serotoninérgica durante el ciclo estral de la rata.

Tesis

Que como parte de los requisitos  
para obtener el Grado de

Maestra en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

LFT. Kenny Alejandra Ruiz García

Dirigido por:

Dra. Nancy Georgina Hernández Chan

Co-Dirigido por:

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Querétaro, Qro. a 30 de noviembre del 2023.



Dirección General de Bibliotecas y Servicios Digitales  
de Información



La expresión del receptor de serotonina 7 en el Núcleo  
Paraventricular del Hipotálamo asociada a la  
neurotransmisión serotoninérgica durante el ciclo  
estral de la rata.

**por**

Kenny Alejandra Ruiz García

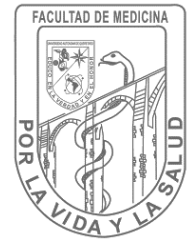
se distribuye bajo una [Licencia Creative Commons  
Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional](#).

**Clave RI:** MEMAC-253655





Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Medicina  
Maestría en Ciencias en Neurometabolismo



La expresión del receptor de serotonina 7 en el Núcleo Paraventricular del Hipotálamo asociada a la neurotransmisión serotoninérgica durante el ciclo estral de la rata.

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de  
Maestra en Ciencias en Neurometabolismo

Presenta

LFT. Kenny Alejandra Ruiz García

Dirigido por:

Dra. Nancy Georgina Hernández Chan

Co-Dirigido por:

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Dra. Nancy Georgina Hernández Chan

Presidente

Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova

Secretaria

Dr. Ricardo Francisco Mercado Curiel

Vocal

Dra. Santiaga Marisela Ahumada Solorzano

Vocal

Dra. María del Carmen Mejía Vázquez

Vocal

Centro Universitario, Querétaro, Qro. México  
Fecha de aprobación por el Consejo Universitario (enero, 2024)

## **Dedicatorias**

A mis padres, Hugo y Lety, y a mi hermano Víctor; quienes me han hecho ser quien soy y me han apoyado en todo momento, sin ellos no podría estar aquí.

¡Todas las gracias a ustedes, hoy y siempre!

## **Agradecimientos**

A mi directora, la Dra. Nancy Georgina Hernández Chan, le agradezco la oportunidad de iniciarme y orientarme en el camino de la investigación, y ser razón de este proyecto.

A mi co-directora, la Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdova, por su apoyo, paciencia y apertura en la realización de este proyecto. Le agradezco especialmente por abrirnos las puertas del laboratorio D12, lo cual fue fundamental para el desarrollo de esta investigación.

Agradezco a la Biol. María Soledad Mendoza Trejo, cuya colaboración fue vital para el desarrollo de esta investigación, su disposición, su apoyo y amabilidad facilitaron enormemente el desarrollo de esta investigación.

A la Dra. Alejandra Castilla León, encargada del bioterio de la UNAM en Juriquilla, por su contribución en la determinación de las fases del ciclo estral de las ratas.

Además, deseo reconocer y agradecer a todos aquellos con los que conviví en el laboratorio D12, sus contribuciones conscientes o inadvertidas fueron fundamentales en mi proceso de desarrollo durante la maestría.

Al M.en C. Jonathan Sánchez Yépez y la Dra. Isela Hernández Plata por siempre apoyarme a lo largo de mi estancia en el laboratorio. Cada interacción en el laboratorio contribuyó en mi crecimiento académico y personal. Estoy agradecida de haber compartido este viaje con ustedes.

Al programa de Apoyo de Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológicas UNAM-DGAPA-PAPIIT: 212522 y proyecto CONACYT 251510 por el financiamiento otorgado para la realización de este proyecto de investigación.

## Índice

<b>Índice de Figuras</b>	<b>8</b>
<b>Índice de Imágenes</b>	<b>9</b>
<b>Abreviaturas y Siglas</b>	<b>10</b>
<b>Resumen</b>	<b>12</b>
<b>I. Introducción</b>	<b>13</b>
<b>II. Antecedentes</b>	<b>16</b>
A. Acción de los estrógenos en el sistema nervioso central	16
B. Dimorfismo sexual	16
C. Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal	17
D. Estrés agudo y crónico	19
E. Núcleo Paraventricular	21
F. Eje HPA y serotonina	22
G. Receptores de estrógeno	25
H. Ciclo estral de la rata	27
<b>III. Hipótesis</b>	<b>30</b>
<b>IV. Objetivos</b>	<b>30</b>
IV.I. Objetivo general	30
IV. II Objetivo específicos	30
<b>V. Metodología</b>	<b>30</b>
V.I. Citología vaginal	31
V.II. Histología de úteros	32
V.III. Inmunohistoquímica	32
V.IV. Cromatografía líquida de alta resolución	33
V.V. Procedimientos estadísticos	35

<b>VI. Resultados</b>	<b>35</b>
VI.I. Identificación de grupos por Citología Vaginal.	35
VI.II. Identificación de Núcleo Paraventricular	37
VI.III. Inmunohistoquímica de receptor 5-HT7 en Núcleo Paraventricular	37
VI. IV. Conteo celular	40
VI.IV.I. Corte Anterior	41
VI.IV.II Corte Medio	42
VI.IV.III Corte Posterior	44
VI. V. Cuantificación de 5-HT y 5-HIAA mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)	45
<b>VII. Discusión</b>	<b>47</b>
<b>VIII. Conclusión</b>	<b>52</b>
<b>IX. Bibliografía</b>	<b>54</b>
<b>X. Anexos</b>	<b>64</b>
X.I. Carta de aprobación de Comité de Bioética	64
X.II. Carta Registro del Protocolo de Investigación	65
X.III. Evidencia Fotográfica	66
X.IV. Conteo celular	67



## Índice de Figuras

Figura 1	Liberación circadiana de corticosterona en sangre de ratas hembras y machos.	19
Figura 2	Patrón esquemático de las concentraciones de estradiol, progesterona y hormona luteinizante en el ciclo estral en la rata.	28
Figura 3	Diagrama de flujo de evaluación de Frotis vaginal.	32
Figura 4	Comparación de inmunopositividad a 5-HT7r de NPV en los tres niveles	42
Figura 5	Concentración de 5-HT y 5-HIAA en amígdala.	46
Figura 6	Comparación de concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en corteza prefrontal, hipotálamo e hipocampo	47

## Índice de Imágenes

Imagen 1	Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal en humanos.	18
Imagen 2	Vía de señalización clásica del estrógeno.	25
Imagen 3	Frotis vaginal representativo de las fases del ciclo estral.	37
Imagen 4	Fotografías representativas los cortes del útero teñidas con hematoxilina-eosina.	38
Imagen 5	Identificación de NPV con violeta de cresilo.	39
Imagen 6	Referencias anatómicas de los tres niveles del NPV y sus divisiones.	40
Imagen 7	Inmunopositividad de 5-HT7r NPV de rata macho.	41
Imagen 8	Comparación de la inmunopositividad de 5-HT7r en corte anterior de NPV.	43
Imagen 9	Comparación de la inmunopositividad de 5-HT7r en corte medio de NPV.	44
Imagen 10	Comparación de la inmunopositividad de 5-HT7r en corte posterior de NPV.	45

## **Abreviaturas y Siglas**

5-HT: Serotonina

5-HT<sub>r</sub>: Receptores 5-hidroxitriptamina

5-HT<sub>7r</sub>: Receptor 5-hidroxitriptamina 7

5-HIAA: Ácido 5-hidroxindolacético

ACTH: Hormona Adrenocorticotrópica

AVP: Arginina Vasopresina

CRH: Hormona Liberadora Corticotropina

E2: Estradiol

Eje HPA: Eje Hipotálamo-Pituitaria-Adrenal

ER $\alpha$ : Receptores de estrógenos alfa

ER $\beta$ : Receptores de estrógenos beta

ERE: Elementos de respuesta a estrógenos

GR: Receptores de Glucocorticoides

HPLC-ED: Cromatografía líquida de alta resolución con detección electroquímica

ISRS: Inhibidores de la recaptación de serotonina

LH: Hormona Luteinizante

MAO: Monoaminoxidasa

MR: Receptores de Mineralocorticoides

NPV: Núcleo Paraventricular

OT: Oxitocina

PR: Receptores de Progesterona

PCA: Ácido Perclórico

RVLM: Rostroventral de la médula oblongada

SERT: Transportador de Serotonina

TPH: Triptófano Hidroxilasa

TRH: Hormona Liberadora Tirotropina

## RESUMEN

El núcleo paraventricular (NPV) es el activador del eje hipotálamo- pituitaria-adrenal (HPA) durante el estrés. El NPV expresa al receptor de estrógenos beta ( $ER\beta$ ) y varios receptores de serotonina (5-HT<sub>r</sub>) involucrados en la regulación del estrés, entre ellos, el 5-HT<sub>7r</sub>. Se sugiere que los estrógenos son potenciadores del eje HPA. Datos epidemiológicos mundiales sostienen que la depresión mayor y la ansiedad, asociados al estrés y a alteraciones del eje HPA, tienen una prevalencia 2:1 mayor en mujeres que en hombres. Esta tendencia coincide con la instauración del ciclo menstrual, por lo que los estrógenos podrían desempeñar un papel relevante en la fisiología y fisiopatología del eje HPA.

En este estudio, se evaluó la expresión del 5-HT<sub>7r</sub> en el NPV por inmunohistoquímica y la concentración de serotonina (5-HT) y el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), en las regiones reguladoras del NPV durante el ciclo estral. Las fases del ciclo estral se determinaron por citología vaginal e histología de úteros con hematoxilina y eosina. Para la expresión de 5-HT<sub>7r</sub>, se colectaron los niveles anterior, medio y posterior del NPV de animales en proestro, estro, diestro, metaestro, y un grupo de machos. Se encontró menor inmunopositividad a 5-HT<sub>7r</sub> en el estro y metaestro en el nivel anterior del NPV comparado con los machos y otras fases del ciclo. Se encontró una concentración significativamente mayor de 5-HT y 5-HIAA por HPLC en amígdala en el proestro, comparadas con las otras fases del ciclo.

Los resultados sugieren que la serotonina podría modular la actividad del eje HPA por medio de las regiones amigdalinas que proyectan hacia el NPV. Además, nuestros resultados proponen que el 5-HT<sub>7r</sub> presenta menor expresión en fases que corresponden a menor liberación de estrógeno, lo que promueve la idea del estrógeno como regulador del eje HPA.

Palabras clave: Núcleo paraventricular, eje HPA, sistema serotoninérgico, estradiol, ciclo estral, 5-HT<sub>7r</sub>.

## I. INTRODUCCIÓN

La Organización Mundial de la Salud, en 2021 ha descrito a la depresión y la ansiedad como los trastornos mentales con mayor incidencia en la salud mental pública. Se estima que entre 2011 y 2030, los trastornos mentales tendrán un impacto económico mundial de \$16.3 mil millones de dólares. Los reportes de prevalencia ascienden en la población mundial con cifras que oscilan entre 284 millones de casos estimados con ansiedad y 264 millones de personas con depresión. Estos trastornos afectan al estado de ánimo, la integridad física de quien lo padece, por lo que su prevalencia a largo plazo puede llevar a la disminución de la calidad de vida, la discapacidad o incluso al suicidio, en el caso de la depresión.

Desde esta perspectiva, la investigación básica tiene la intención de analizar los fundamentos biológicos que subyacen a las alteraciones afectivas como la depresión mayor y la ansiedad, que afectan en mayor medida a la población femenina mundial. Particularmente, se sabe que las mujeres presentan mayor incidencia de depresión mayor en comparación con los hombres, alcanzando incluso una relación 2:1 en algunos estudios epidemiológicos (Li y Graham, 2017; Kuehner, 2017; Hori et al., 2016; Albert, 2015). Estas estimaciones se repiten a nivel mundial, incluso a pesar de la diversidad cultural, económica y social entre los países. También, los estudios para conocer los mecanismos fisiopatológicos y de tratamiento de la depresión mayor, se han realizado casi exclusivamente en modelos experimentales con animales macho, así como en ensayos clínicos con hombres (Pavliidi et al., 2021). Resulta relevante el hecho que los fármacos antidepresivos generados con estas estrategias, son ineficaces para aproximadamente 1/3 de la población (Slifirsky, 2021; Borbély, 2022). Por ello, es crucial realizar investigaciones que se centren en la comprensión de la fisiología femenina, a fin de comprender mejor las diferencias fisiológicas por sexo y, optimizar u especializar la terapéutica.

Es importante recalcar que la literatura científica señala que la fisiología del eje HPA, responsable de regular el estrés (y principal diana terapéutica en la depresión y la ansiedad), muestra respuestas distintas entre los sexos en modelos murinos y humanos. Por ejemplo, se sabe que el Núcleo Paraventricular (NPV) presenta diferencias dimórficas de expresión de algunos péptidos como la arginina vasopresina (AVP), la oxitocina (OT) y el receptor de estrógeno beta ( $ER\beta$ ) (Oyola et al., 2017). Estas diferencias morfológicas del NPV podrían tener implicaciones significativas en la regulación del estrés y, consecuentemente en la conducta de machos y hembras.

Por otra parte, se sabe que algunos sistemas de neurotransmisión como el sistema serotoninérgico desempeñan funciones para la fisiología normal del eje HPA, así como en la emergencia de los trastornos afectivos como la depresión mayor y la ansiedad (Haleem, 2022; Wirth et al., 2017; Donner y Handa, 2009). La serotonina o 5-hidroxitriptamina actúa a través de una familia de receptores de amplia localización en el encéfalo de los mamíferos. Los receptores de serotonina (5-HT<sub>r</sub>) se encuentran distribuidos en regiones cerebrales involucradas con la respuesta de estrés como el hipocampo, la amígdala, la corteza prefrontal y el NPV en el hipotálamo. Particularmente, los receptores 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>1C</sub>, 5-HT<sub>2C</sub>, 5-HT<sub>4</sub> y 5-HT<sub>7</sub>, se encuentran expresados en el NPV y se han asociado a la modulación de la respuesta del eje HPA durante el estrés agudo y crónico (Bamalam et al., 2020). También, se ha descrito que en ratas macho, sometidas a estrés crónico, la expresión de 5-HT<sub>7r</sub> disminuye en el NPV, lo que se asocia con una sensibilización del eje HPA, reflejada por la disminución significativa en la liberación de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) y el aumento significativo de corticosterona (García-Iglesias et al., 2013). Estos hallazgos respaldan la relevancia del receptor 7 en la respuesta del eje HPA y sugieren su posible implicación en trastornos que tienen al estrés como factor predisponente como la depresión y ansiedad.

Datos de modelos experimentales de trastornos como la depresión mayor y la ansiedad, así como reportes clínicos han documentado que estos se asocian con

alteraciones en el sistema serotoninérgico y la regulación del eje HPA (Haleem, 2022; Wirth et al., 2017). En las últimas dos décadas, se ha propuesto que existe una relación entre la actividad estrogénica y los cambios morfo-funcionales en los cerebros masculinos y femeninos, tanto en roedores como en humanos (Hernández-Hernández, 2019; Handa y Weiser, 2014; Donner y Lowry, 2013).

Por otra parte, existe evidencia de que el estrógeno funciona como un potenciador del eje HPA, lo cual se traduce en una mayor liberación de corticosterona en las ratas macho tratadas con estrógeno, así como en niveles basales más elevados del glucocorticoide en las hembras (Goel, 2014). Estos hallazgos resaltan la importancia del estrógeno en la regulación del eje HPA y sugieren que podría desempeñar un papel relevante en el desarrollo de los trastornos asociados con alteraciones del eje HPA.

Datos de la literatura, proponen una interacción entre la serotonina y sus receptores, el estrógeno y el eje HPA, en la regulación fisiológica del estrés; así como en la fisiopatología de los trastornos como la depresión mayor y la ansiedad (Hamidovic et al., 2020; Hernández-Hernández, 2019; McAllister et al., 2012). Por lo tanto, se sugiere que la susceptibilidad de las mujeres a padecer ansiedad y/o depresión puede estar influenciada por un componente biológico promovido por el estrógeno.

Así, comprender estas interacciones basales entre el estrógeno y la regulación del eje HPA por mecanismos serotoninérgicos puede contribuir al desarrollo de enfoques terapéuticos más efectivos y específicos para tratar estos trastornos. Por ello, el objetivo de este proyecto es documentar si la expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> muestra variaciones acordes a las fases del ciclo estral de la rata, ya que se desconoce de su expresión basal en el hipotálamo murino.



## **II. ANTECEDENTES**

### **A. Acción de los estrógenos en el sistema nervioso central**

Los estrógenos desempeñan funciones biológicas importantes en el organismo, tales como la localización y almacenamiento de grasa corporal, regulación del peso corporal (Fuente-Martín et al., 2013), así como numerosas acciones en distintas áreas del sistema nervioso central debido a que intervienen en la regulación del estado de ánimo, la memoria (Hori et al., 1988), la termorregulación (Brinton et al., 2015) y el balance energético (Xu et al., 2011), entre otros.

Se sabe que los estrógenos regulan la expresión de varios elementos de la neurotransmisión serotoninérgica como la triptófano hidroxilasa 2 (TPH2) enzima cerebral de síntesis de serotonina, así como de la enzima de degradación monoamino oxidasa A (MAO-A) y algunos receptores como el 5-HT1A (Haleem, 2022; Hernández-Hernández et al., 2019; McAllister et al., 2012, Donner y Handa, 2009).

### **B. Dimorfismo sexual**

El dimorfismo sexual es la presencia de características que permiten distinguir a machos y hembras de una especie (Mesnick y Ralls, 2018). Estas cualidades diferentes entre sexos pueden presentarse desde el nacimiento, o bien establecerse después de la pubertad. El dimorfismo puede ser observable a través de características externas como la talla, la densidad muscular o la presencia de caracteres secundarios. Sin embargo, el dimorfismo también puede presentarse en sitios menos perceptibles, por ejemplo, en órganos como el cerebro en humanos y animales, a nivel anatómico como a nivel funcional y molecular. Por ejemplo, en el humano algunas regiones corticales involucradas con la producción de lenguaje como el giro de Heschl y el giro supramarginal son más densas en mujeres (De Lima et al., 2019). También, se ha documentado que algunas áreas hipotalámicas que guardan relación con la reproducción como el núcleo supraquiasmático y el área

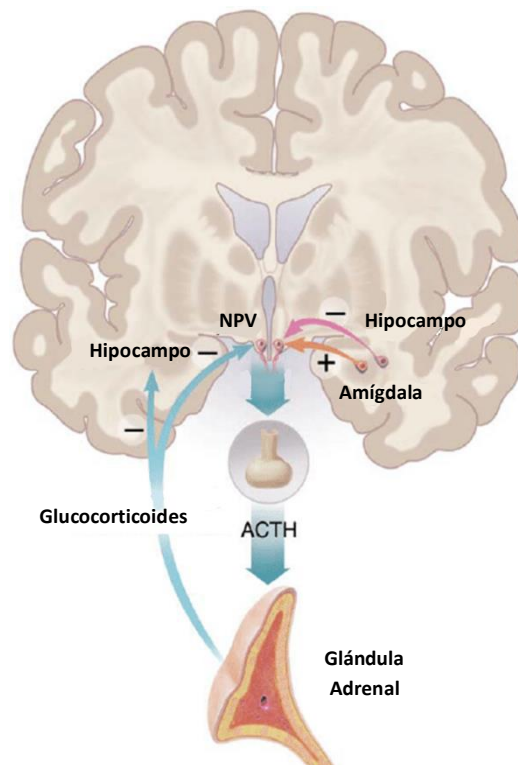
preóptica medial son distintas entre sexos en los humanos y otros mamíferos como los roedores (Hoffman y Swaab, 1991). Otra de las regiones cerebrales que muestra dimorfismo funcional es el eje de respuesta (eje HPA), encargado de la respuesta de estrés en mamíferos y otros animales. Respecto al mismo, se ha descrito como más reactivo en roedores hembra que en roedores macho. Se sabe que diversos estímulos inductores de estrés como la carrera forzada, la inmovilización y los choques en las patas, incrementaban de manera más rápida el nivel de corticosterona en hembras que al ser comparadas con la respuesta en machos (Kant et al., 1983).

En humanos, se considera también la posibilidad de que el estrógeno genere circuitos serotoninérgicos anatómica y fisiológicamente distintos que alteren la actividad del eje HPA (Donner y Lowry, 2013), sistemas que se ven comprometidos en el desarrollo de trastornos afectivos como la ansiedad y la depresión mayor (Donner y Handa, 2009; Albert, 2015; Kuehner, 2017). Estos hallazgos que se encuentran en animales utilizados para la experimentación y en seres humanos, sugieren que la diferencia de prevalencia entre sexos podría ser influido por factores biológicos como los efectos del estrógeno sobre el eje HPA (Albert, 2015; Kuehner, 2017).

### **C. El eje Hipotálamo-Pituitaria- Adrenal**

El eje HPA es el encargado de la activación de la respuesta neuroendocrina al estrés. En situaciones de amenaza, regiones cerebrales como el hipocampo, la amígdala y la corteza prefrontal integran los estímulos que desencadenan la activación del eje HPA para secretar Hormona Liberadora Corticotropina (CRH), la cual viaja en el torrente sanguíneo hasta llegar a sus receptores corticotropos en la hipófisis anterior. En respuesta, estas células secretoras liberan a la ACTH, la cual es vertida a la circulación sanguínea. La ACTH llega a su receptor en la zona glomerulosa de la corteza adrenal, la cual secreta glucocorticoides (Evanson y Herman, 2015, Qin et al., 2018 y Oyola y Handa, 2017), cortisol en los humanos y

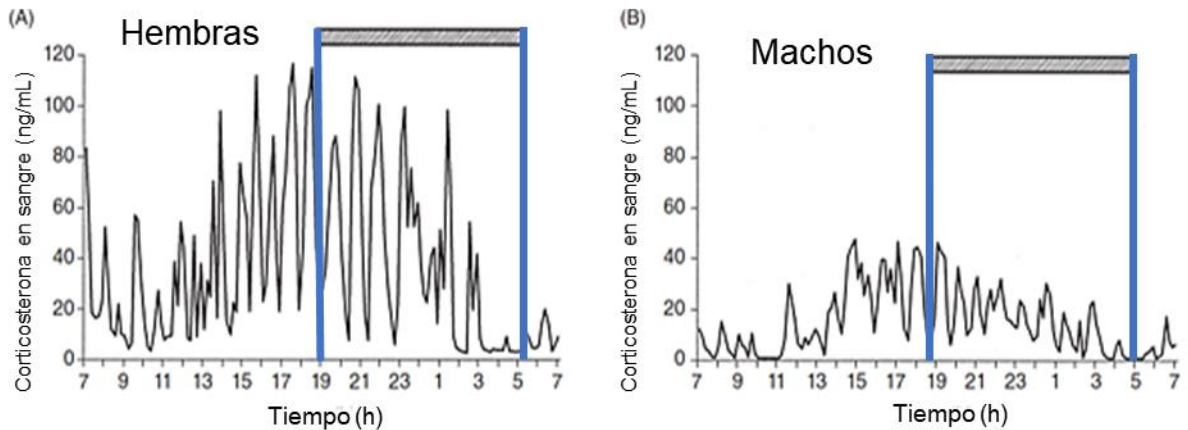
corticosterona en los roedores (Goel et al., 2014). Los glucocorticoides liberados a la circulación general, retornan al encéfalo y se unen a receptores de glucocorticoides (GR) en el NPV y la hipófisis anterior, retroalimentando negativamente al eje HPA, de tal forma que cuando el estímulo de estrés desaparezca, el organismo regrese a sus niveles basales (Lanfume y et al., 2008; Handa y Weiser, 2014) (véase Imagen 1).



**Imagen 1. Eje HPA en humanos.** Comienza en el NPV que libera CRH en la pituitaria anterior que libera a su vez ACTH hacia torrente sanguíneo para dirigirse a la corteza adrenal donde se sintetiza el cortisol (Nestler,2002).

En condiciones basales, el cuerpo humano secreta alrededor de 10 mg de cortisol a lo largo del día con un pico máximo de liberación durante las primeras horas de la fase de luz, mientras que se liberan concentraciones menores en las primeras horas de la fase oscura por efecto del ciclo circadiano (Mullol et al., 1996; Gómez et al., 2007). Estos niveles pueden incrementar hasta 400 mg bajo condiciones de estrés severo (Gómez et al., 2007). En modelos animales como las

ratas, se presentan concentraciones análogas de corticosterona que, en condiciones basales es aproximadamente de 100 ng/mL y que alcanza arriba de 400 ng/ mL en condiciones de estrés agudo (García- Iglesias, 2013). Estas cifras se han documentado en ratas macho, pero reportes recientes han encontrado que la liberación de corticosterona es mayor de forma general en la rata hembra, incluso tomando en cuenta en ciclo circadiano (véase Figura 1).



**Figura 1. Liberación circadiana de corticosterona en sangre de ratas hembras y machos.** Los valores registrados entre las líneas azules representan la fase diurna (Kraan et al., 1998).

Otra de las funciones del eje HPA es regular la respuesta adaptativa de protección y supervivencia, a través de mecanismos autonómicos primordialmente simpáticos, como la respuesta de lucha-huida. Entre los múltiples efectos fisiológicos de esta respuesta, se encuentran el aumento de la actividad del sistema cardiopulmonar para permitir mayor intercambio gaseoso, así como la disposición de los recursos energéticos que para la defensa del organismo. En conjunto, el sistema simpático y el eje HPA permiten afrontar situaciones amenazantes evitando que se quebrante la homeostasis. Dependiendo de la duración de los estímulos, la respuesta puede dividirse en estrés agudo o crónico (Gordon et al., 2017).

#### **D. Estrés agudo y crónico**

Normalmente, la respuesta a estrés se activa frente a situaciones amenazantes que abarcan diversos estímulos físicos como temperaturas extremas, una lesión o

el ejercicio (Rusell y Lightman, 2019); el estrés también involucra factores perceptuales y psicológicos como el aislamiento social o la pérdida de un ser querido. Cuando la respuesta es transitoria, se presenta un pico de liberación de cortisol que retorna paulatinamente a los niveles iniciales cuando se suprime el estímulo estresor; este tipo de estrés aislado y de corta duración, es llamado estrés agudo (Rusell y Lightman, 2019). Cabe destacar que el mecanismo fisiológico de estrés agudo, tiene la finalidad de preservar la integridad del organismo.

Por otra parte, una estimulación repetitiva y prolongada del eje HPA puede generar estrés crónico que consiste en una respuesta desproporcionada y/o innecesaria porque puede responder aún sin la presencia de un estímulo amenazante. A este mecanismo alterado que diverge de la homeostasis, se le denomina “alostasis”. Ya que el sistema del estrés responde de acuerdo el tiempo que perdura el estímulo, la cantidad o la intensidad del mismo, este es vulnerable a la estimulación constante.

De este modo, el estrés crónico tiene numerosas repercusiones fisiológicas (e incluso morfológicas) que inducen un ciclo vicioso debido al daño en los mecanismos de inhibición del eje HPA. Por ejemplo, la liberación constante de cortisol induce sus respuestas como la depresión del sistema inmunológico, la degradación de proteínas y gasto excesivo de las reservas energéticas, lo cual puede traducirse en síntomas como la fatiga. Múltiples sistemas corporales se ven afectados por la elevada concentración de glucocorticoides; particularmente, el sistema nervioso es susceptible a desarrollar cambios degenerativos en estructuras vulnerables como la corteza prefrontal y el hipocampo (Gordon et al., 2017 y Lee et al., 2015).

Es relevante mencionar que entre el 50- 60% de los pacientes con depresión mayor presentan hiperactividad del eje HPA e hipercortisolismo (Butterworth, et al., 2018; Carroll et al., 2007); a la par de alteración de los sistemas serotoninérgicos, involucrados en la regulación del eje HPA, asociados a estrés crónico.

## **E. Núcleo Paraventricular**

El núcleo paraventricular (NPV) se localiza bilateralmente en la región anterosuperior del hipotálamo. El NPV cuenta con diversas poblaciones celulares como sigue: 1) neuronas parvocelulares que liberan péptidos como la AVP, la somatostatina, la hormona liberadora tirotrópica (TRH) y la CRH a través de la glándula pituitaria anterior; 2) neuronas magnocelulares que liberan OT y AVP al torrente sanguíneo vía la pituitaria posterior (Handa y Weiser, 2014); 3) neuronas de proyección larga o pre-autonómicas que liberan OT a través de la pituitaria posterior y, a la par se dirigen hacia la región rostroventral de la médula oblongada (RVLM) (Stern y Zhang, 2003; Tao, 2010; Qin et al., 2018).

La expresión de los péptidos OT y AVP permite que el NPV participe en funciones como la homeostasis hídrica, la lactancia y la contracción uterina (Qin et al., 2018). En tanto, la liberación de TRH involucra al NPV en regular el metabolismo, mediante la iniciación del eje hipotálamo-pituitaria-tiroideas (eje HPT) y finalmente, la expresión de CRH coloca al NPV como el integrador e iniciador de la respuesta del eje HPA, para la modulación neuroendocrina del estrés.

Adicionalmente, el NPV expresa receptores de hormonas esteroideas como los receptores de glucocorticoides (GR), mineralocorticoides (MR), progesterona (PR) y estrógenos (ER) (Handa y Weiser, 2014).

El sistema serotoninérgico al enviar sus proyecciones al núcleo paraventricular (NPV), el centro integrador de la respuesta a estrés. El NPV recibe una robusta inervación serotoninérgica que recibe de los núcleos del rafe; por lo que se considera que la serotonina desempeña un papel importante en la regulación del eje HPA durante el estrés. La serotonina o la 5-hidroxitriptamina (5-HT) es una indolamina que puede unirse a 15 tipos diferentes de receptores transmembranales acoplados a proteínas Gs, Gi y Gq, a excepción del 5-HT3r que es de tipo ionotrópico (Di Giovanni et al., 2020). El NPV expresa también diversos receptores de serotonina como el 5-HT1A, 5-HT1B, 5-HT1D, 5-HT2C y el 5-HT4 (Heisler et al.,

2007; Nautiyal y Hen, 2017) y 5-HT7 (García-Iglesias et al., 2013), que se sugiere están involucrados en la liberación de CRH, primera hormona del eje HPA.

## **F. Eje HPA y serotonina**

Basado en estudios farmacológicos con agentes que inducen la liberación de serotonina, así como con agonistas e inhibidores de su recaptura, es claro que la serotonina ejerce de manera general un efecto estimulador sobre el eje HPA.

Por ejemplo, la fenfloramina, que evita que la serotonina ingrese de nuevo a la neurona presináptica, induce elevación de los niveles de cortisol en personas con depresión mayor (Sher et al., 2004). Por otra parte, la depleción del aminoácido triptófano (precursor de la síntesis de serotonina) en personas sanas susceptibles, induce una reducción del estado anímico concomitante a una disminución en el nivel de cortisol matutino (Vielhaber et al., 2005). Algunos fármacos como la m-clorofenilpiperazina, agonista de los receptores 5-HT<sub>2C</sub>, 1A, 1B y 1D induce el incremento de ACTH y cortisol en el plasma (Feuchtl et al., 2004). Se ha descrito también, que cuando ocurre un incremento en el nivel de serotonina en el NPV, este induce la liberación de CRH (Holmes et al., 1982) y ACTH a través de la unión de la indolamina con los receptores serotoninérgicos 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> y posiblemente 5-HT<sub>1B</sub> (Jørgensen et al., 2002).

Semejante a la manera en que ocurre con otros neurotransmisores y sus receptores, la acción de la serotonina depende del tipo de receptor al que se una, así como la densidad y afinidad de los mismos. Por tal motivo, las familias y subtipos de receptores de serotonina tienen configuraciones muy específicas en cada región del sistema nervioso para la coordinación de la acción serotoninérgica, a través de diferentes niveles de afinidad, susceptibilidad a la desensibilización/ re-sensibilización y vía de transducción (estimulación/inhibición) que responde dependiendo los cambios del ambiente fisiológico (Uphouse, 1997). Por ejemplo, en concentraciones bajas de serotonina, se puede reducir la cantidad de glucocorticoides plasmáticos, debido a que a nivel central los receptores 5-HT<sub>1A</sub>

(con mayor afinidad que otros) tienen efectos inhibitorios sobre el eje HPA. En cambio, se ha documentado que la alta concentración de serotonina (que ocurre en episodios de estrés o ante la administración de fármacos antidepresivos inhibidores del transportador de serotonina (SERT), activa a los receptores con efecto estimulador como los receptores 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>4</sub> estimulando al eje HPA (Uphouse, 1997).

Durante el estrés, las proyecciones de serotonina dirigidas a las interneuronas del NPV cercanas a las neuronas liberadoras CRH, tienen un efecto estimulador sobre la actividad del eje HPA (Sher et al., 2004; Feuchtl et al., 2004). Recientemente se documentó que el estrés crónico de restricción, eleva los niveles de serotonina en NPV paralelo al aumento de ACTH y cortisol en la rata macho. Tal efecto, se redujo en los animales que recibieron una dosis del antagonista del receptor 5-HT<sub>7</sub>, SB-656104 (García-Iglesias et al., 2013). En este trabajo, también se documentó que la expresión del receptor 5-HT<sub>7</sub> disminuyó en animales sometidos a estrés de tipo restrictivo por 20 minutos durante 14 días. Aunque este trabajo se centra en la regulación del 5-HT<sub>7</sub>r sobre el eje HPA durante situaciones de estrés, se ha observado que los estrógenos presentan un efecto potenciador del eje HPA en ratas macho que han sido sometidas a orquiectomía, mientras que los andrógenos tienen un efecto inhibitorio en dicho eje (Lund et al., 2004). También se ha documentado que hay mayores niveles de ACTH y corticosterona en las ratas hembra en comparación al sexo opuesto, en condiciones basales y de estrés agudo (Goel et al., 2014). Aunque se sugiere que el receptor 7 de serotonina está involucrado en la regulación del eje HPA, se desconoce si la función del mismo es semejante entre sexos.

Se ha reportado que los glucocorticoides podrían regular la expresión de algunos receptores de serotonina involucrados en la patogénesis de la depresión mayor como el 5-HT<sub>1A</sub>. Particularmente para la rata hembra, Haleem y colaboradores (2022) documentaron que los glucocorticoides tienen un efecto sobre la transcripción y traducción de algunos receptores de serotonina como el 5-HT<sub>1A</sub>.



En este trabajo se observó que las ratas sometidas a adrenalectomía mostraron un aumento del receptor 1A de serotonina, así como de su ARNm. Este incremento tanto en proteína como el ARNm, fue paralelo a la reducción de los niveles de CRH, ACTH y corticosterona (Haleem, 2022).

Se ha encontrado también, que los estrógenos están involucrados en regular la neurotranscripción de serotonina, como la enzima triptófano hidroxilasa 2 (TPH2) que sintetiza serotonina en sistema nervioso central, de las enzimas MAO-A y B que permiten la degradación presináptica, así como del SERT que se encargan de la recaptura; y algunos receptores como 5-HT1A.

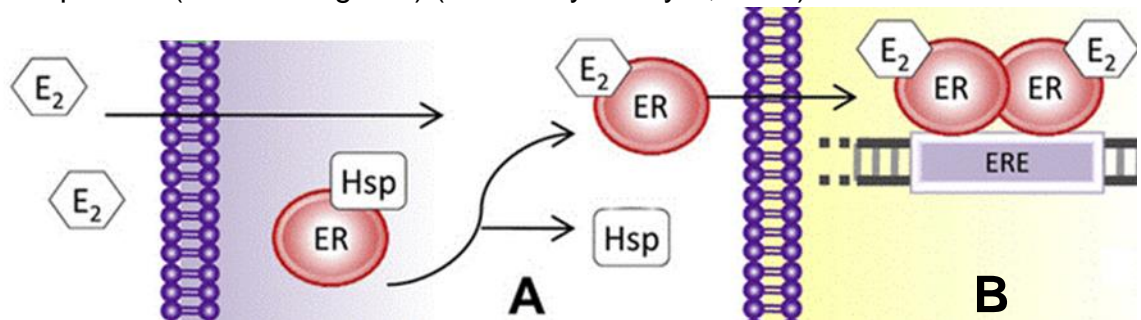
Cabe mencionar que los elementos de la neurotransmisión serotoninérgica antes mencionados están implicados en la depresión, que tiene mayor prevalencia en mujeres que en hombres, así como que las mujeres responden mejor a los tratamientos que utilizan inhibidores de la recaptación de la serotonina (ISRS) (LeGates et al., 2019). Se ha demostrado que la terapia hormonal sustitutiva elimina la mala respuesta a los ISRS en las mujeres, lo que sugiere que las hormonas sexuales participan en la respuesta terapéutica de los ISRS. El ciclo reproductivo tiene un impacto significativo en los trastornos depresivos, y los síntomas suelen empeorar durante la fase premenstrual. Las mujeres con antecedentes de depresión tienen un mayor riesgo de presentar síntomas depresivos después de la menopausia. El embarazo y el parto también pueden desencadenar episodios depresivos, con síntomas que se presentan durante el embarazo o el posparto. Los trastornos menstruales también se han relacionado con la depresión (LeGates et al., 2019), por lo que se sugiere que los estrógenos podrían participar en la regulación de la expresión de alguno de ellos, debido a su capacidad de actuar como factor de transcripción (Hernández-Hernández et al., 2019).

### **G. Receptores de estrógeno**

Los estrógenos actúan a través de receptores específicos se dividen en dos subtipos a saber, los alfa ( $ER\alpha$ ) y beta ( $ER\beta$ ). Estos pertenecen al conjunto de

receptores perinucleares de hormonas esteroideas que regulan la expresión génica de modo estrógeno-dependiente (Mitra et al., 2003; Hewitt y Korach, 2018).

La naturaleza lipídica del estrógeno le permite atravesar fácilmente la membrana plasmática para ingresar al citoplasma donde se encuentran los receptores. Su activación depende de la unión del estrógeno con sus receptores para la formación de complejos, que resultan de la unión hormona-receptor dentro del citoplasma (Véase imagen 2) (Fuentes y Silveyra, 2019).



**Imagen 2. Vía de señalización clásica del estrógeno.** El estradiol ( $E_2$ ) atraviesa la membrana celular para unirse a los receptores estrógenos (ER's) y liberarlos de las Heat Shock Proteins (HSP) (A) formando dímeros que se unen a segmentos del ADN llamados elementos de respuesta a estrógenos (ERE) (B) para actuar como factores de transcripción (Gambino et al., 2012).

El estrógeno forma un complejo al unirse a su receptor, la unión de dos complejos ligando-receptor forma un dímero, este dímero tiene la capacidad de actuar como factor de transcripción para unirse a los ERE que permiten la incorporación de diversas proteínas correguladoras que modifican el empaquetamiento de la cromatina y reclutan a la ARN polimerasa II para la transcripción genética (Heldring et al., 2007).

Diversos estudios sugieren que los estrógenos pueden regular la actividad del eje HPA tanto en hembras como en machos (De Nicola et al., 2006; Handa et al., 2012; Heck y Handa, 2019). Se sabe que existe una superposición de ambos receptores de estrógenos en diversas áreas del sistema nervioso central, como en hipocampo donde el ER $\alpha$  puede trabajar complementaria o antagónicamente y tener

roles distintos en regular la conectividad sináptica (McEwen et al., 2012), así como el área preóptica, el núcleo del lecho de la estricta terminal (BNST), la sustancia gris periacueductal, la amígdala medial y el núcleo del tracto solitario (Handa et al., 2012). En contraste, otras regiones como el NPV expresan casi de manera exclusiva el ER $\beta$ , el cual muestra diverso grado de colocalización y dimorfismo en las neuronas que expresan OT (70% en ambos sexos), AVP (18% hembras y 4% machos) y CRH (48% en ambos sexos) (Oyola et al., 2017).

Algunos estudios han encontrado que la inyección bilateral de un antagonista estrogénico en el NPV en ratas intactas y ovariectomizadas, disminuye la secreción de corticosterona posterior a un episodio agudo de restricción (Isgor et al., 2003); se sugiere que este efecto involucra al ER $\beta$ . Más aún, algunos estudios en ratas en proestro y ovariectomizadas han reportado que el nivel local de estrógeno en el NPV aumenta en ambas condiciones, después de una hora de estrés de restricción (Liu et al., 2011). Asimismo, se encontró que el ARNm de ER $\beta$  y de la enzima aromatasa incrementaron en el NPV en los animales en proestro, pero no en los ovariectomizados. Tomado en conjunto, los reportes anteriores sugieren que el estrógeno actuando a través del ER $\beta$  participa en modular al eje HPA y posiblemente en regular al NPV en la expresión de genes.

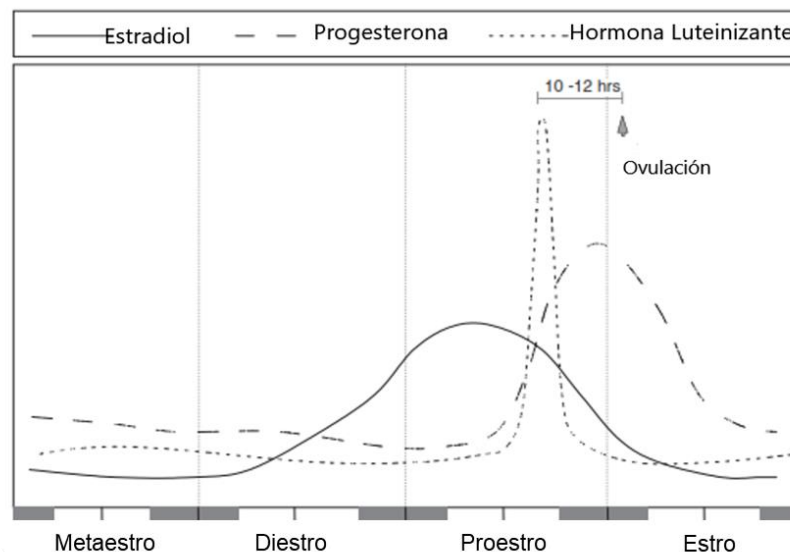
## **H. Ciclo estral de la rata**

Los modelos animales desempeñan un papel fundamental en la investigación científica al permitir a los investigadores elucidar mecanismos fisiológicos y patológicos que son análogos entre diferentes especies, como los roedores y los humanos. Estos modelos proporcionan una herramienta valiosa para comprender cómo los procesos biológicos funcionan en un contexto más general y cómo los resultados de los estudios pueden traducirse a la biología humana.

Un ejemplo interesante de la utilidad de modelos animales en la investigación es el estudio de la actividad del ciclo menstrual en las mujeres, que está relacionada con la acción de hormonas como los estrógenos. Para investigar estos procesos en

un entorno controlado y ético, los científicos han recurrido al estudio de los cambios que ocurren durante el ciclo estral en la rata albina que es un modelo ampliamente utilizado en investigación biomédica. A pesar de las diferencias significativas entre las especies, los paralelismos en la regulación hormonal y los patrones de respuesta permiten obtener información valiosa sobre la influencia de los estrógenos en la regulación del ciclo menstrual en las mujeres (Krishnan y Nestler, 2011). Estos estudios en modelos animales contribuyen a ampliar nuestro conocimiento sobre la reproducción y a desarrollar enfoques terapéuticos potenciales para trastornos relacionados con el ciclo menstrual en las mujeres.

El ciclo estral es un conjunto de procesos regulados por el eje hipotálamo-hipófisis- ovario, que se repiten de forma periódica con el objetivo de producir óvulos para la fecundación y preparar al útero para la gestación. En roedores, este proceso tiene una duración aproximada de 4.8 días y se encuentra dividido en cuatro fases denominadas: Proestro, Metaestro, Estro y Diestro (Cora et al., 2015) (Véase en Figura 2).



**Figura 2. Patrón esquemático de las concentraciones de estradiol, progesterona y hormona luteinizante en el ciclo estral en la rata.** La fluctuación de hormonas a lo largo del ciclo permite la distinción de 4 fases: metaestro, diestro, proestro y estro (Goldman, 2007).

El ciclo estral se encuentra maduro alrededor de la sexta semana de edad de la rata al establecerse la liberación periódica de estrógeno, progesterona y hormona luteinizante (Ajayi y Akhigbe, 2020; Westwood, 2018). La fluctuación de estas hormonas induce cambios en la histología y citología del sistema reproductor que permiten identificar cada una de las fases (Westwood, 2008; Cora et al., 2015; Fernández et al., 2021).

El proestro se caracteriza por la liberación de la hormona luteinizante (LH) por acción del estrógeno, que prepara al útero con la proliferación de células epiteliales nucleadas durante 10 a 12 horas. Posteriormente ocurre la liberación de los óvulos en la fase del estro que se caracteriza por la presencia de células queratinizadas y anucleadas en el útero durante 25 a 27 horas. En el metaestro ocurre la liberación leucocitaria con 6 a 8 horas de duración donde ocurre la completa descamación de células escamosas y finalmente el diestro presenta una cantidad pequeña de leucocitos en comparación con el metaestro, esta fase presenta una duración aproximada de 55 a 57 horas donde se observa el inicio de proliferación de células nucleadas que darán la apariencia inicial del diestro (Cora et al., 2015).

La liberación de estrógeno durante el proestro en el ciclo estral se asocia con el aumento de la liberación de cortisol en sangre (Fanson et al., 2014), esto hace suponer una asociación entre el ciclo estral y la liberación de glucocorticoides.

Otros estudios en animales han encontrado que los estrógenos incrementan la actividad del eje HPA, mientras que los andrógenos la reducen. Algunos de esos trabajos han documentado que en machos gonadectomizados sometidos a estrés de restricción, el estradiol incrementa significativamente los niveles de las hormonas corticosterona y ACTH, comparado con aquellos tratados con propionato de dihidrotestosterona (Lund et al., 2004). Paralelo al incremento hormonal, se encontró un incremento en el RNAm de c-fos, así como un incremento en el RNAhn (heteronuclear) de CRH y AVP en el núcleo paraventricular, asociada al tratamiento estrógeno.

En concordancia con los hallazgos anteriores, otros grupos de investigación han reportado que, aunque la activación de diversas áreas cerebrales involucradas con el procesamiento de estímulos estresantes, como la región anteroventral de los núcleos del lecho de la estría terminal (BNSTav), el área preóptica medial del hipotálamo (MPOA) y el propio NPV, son semejantes entre ratas macho y hembra; la magnitud de la expresión de c-fos y CRH, así como los niveles de hormonas ACTH y corticosterona fueron significativamente más elevadas en la rata hembra con ciclo estral, comparadas con los machos en el protocolo de estrés agudo por restricción (Babb et al., 2013).

### **III. HIPÓTESIS**

El 5HT7r mostrará cambios en su expresión en el NPV simultáneo a diferencias en la neurotransmisión serotoninérgica en sus aferencias durante el ciclo estral de la rata.

### **IV. OBJETIVOS**

#### **IV. I. OBJETIVO GENERAL**

- Determinar la expresión del receptor de serotonina 5-HT7 en el NPV a lo largo del ciclo estral de la rata.

#### **IV.II. OBJETIVO ESPECÍFICOS**

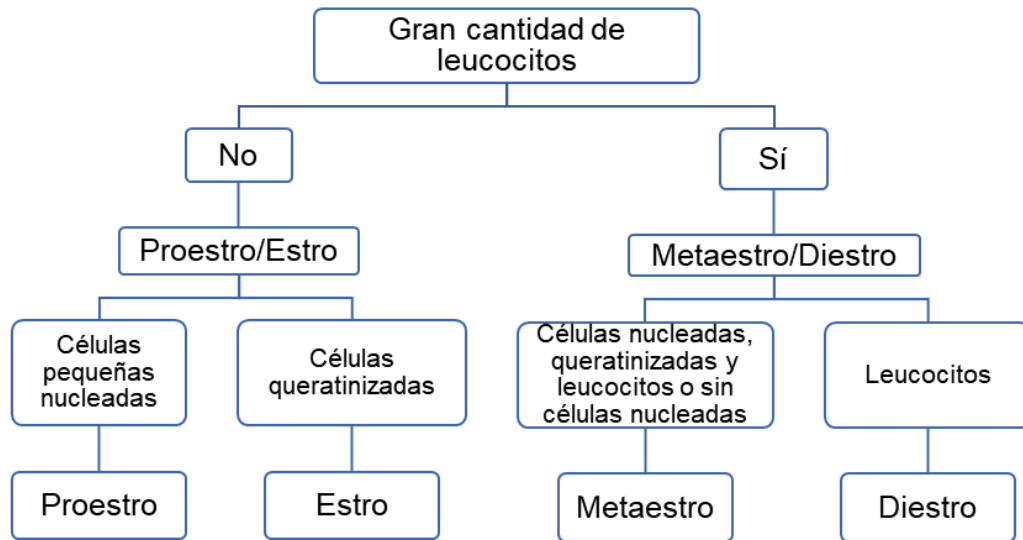
- Identificar la fase del ciclo estral de acuerdo a las características citológicas en el endometrio de las ratas.
- Determinar la expresión del receptor 5-HT7 en el NPV en las diferentes fases de la rata mediante inmunohistoquímica.
- Determinar las concentraciones de serotonina y 5-HIAA en hipotálamo, hipocampo, amígdala y corteza prefrontal mediante técnica de HPLC.

## **V. METODOLOGÍA**

En el presente estudio se emplearon 57 ratas de la cepa Wistar del bioterio del Instituto de Neurobiología, campus Juriquilla de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las ratas tenían un peso corporal entre 230 y 300 gramos, con edad mayor a 8 semanas. Se consideró una n=5 para cada una de las fases del ciclo estral para la evaluación del receptor 7 por inmunohistoquímica; también se incluyó un grupo de ratas macho (n=5). Para la cuantificación de serotonina y ácido 5-hidroxiindolacético, se asignó una n=8 ratas hembra por cada fase del ciclo.

### **V.I. Citología vaginal**

La determinación de las fases del ciclo estral de las ratas, se realizó mediante el análisis de frotis vaginales con la finalidad asignar sistemáticamente a los animales a los grupos correspondientes de una de las cuatro fases del ciclo: metaestro, proestro, diestro y estro, hasta completar una n=5. El procedimiento consistió en la administración intravaginal de 0.1ml a 0.2 ml de solución salina al 0.9%, utilizando pipetas de transferencia de 3.2ml, una vez que se inserta la pipeta se extrajo el frotis vaginal y se colocó en un portaobjetos para ser evaluado bajo el microscopio. Las características citológicas de las fases fueron determinadas siguiendo los parámetros establecidos por Cora y colaboradores (2015), en un lapso entre 30 y 90 minutos antes de la perfusión intracardiaca mediante el siguiente diagrama de flujo (véase Figura 3).



**Figura 3. Diagrama de flujo de evaluación de Frotis vaginal.** Protocolo utilizado para la detección de las fases del ciclo estral por la técnica de citología vaginal. Modificado de Cora et al. (2015).

## V.II. Histología de útero: Tinción con Hematoxilina y Eosina

Dado que algunas fases del ciclo estral en la rata tienen una duración corta de pocas horas, los úteros de los animales obtenidos después de la perfusión, fueron procesados con la técnica de tinción de hematoxilina y eosina (H&E), acorde al protocolo siguiente: Tras la fijación de las muestras, estas se incluyeron en parafina para realizar cortes de 10 micras de espesor. Posteriormente, se transfirieron a portaobjetos y se sumergieron en agua destilada, seguido de xileno para su desparafinización. Una vez desparafinizadas, las secciones se hidrataron sumergiéndolas en concentraciones decrecientes de alcohol etílico de 100%, 95% y 70%. Luego, los cortes se tiñeron con hematoxilina por 10 minutos y, tras lavados se tiñeron con eosina durante 3 minutos. Finalmente, los cortes se cubrieron con resina para su posterior análisis histológico bajo un microscopio óptico usando los criterios histológicos del útero descritos por Westwood en 2008.



### V.III. Inmunohistoquímica

Para la obtención de tejidos, los animales se eutanizaron con una dosis intraperitoneal de pentobarbital sódico (50 mg/kg). Bajo sedación profunda, previa ausencia del reflejo de flexión pedal, se realizó la disección de tórax para la punción del ventrículo izquierdo. Se perfundió solución amortiguadora de fosfatos (PBS, 0.1M, pH = 7.4) hasta el blanqueamiento de órganos, seguido de 350 mL de paraformaldehído al 4% por animal. Posterior a la fijación, se extrajeron los cerebros y úteros. Estos se mantuvieron en frascos de vidrio con paraformaldehído al 4% durante 24 horas a 4°C para fijación completa; posterior a este tiempo, los cerebros se transfirieron a una solución de sacarosa al 30 % para su crioprotección hasta su corte y procesamiento.

Se realizaron cortes coronales de 30 µm de grosor en microtomo, abarcando regiones anteriores, mediales y posteriores del NPV para los 5 encéfalos por condición. Los cortes se mantuvieron en anticongelante a 4°C hasta ser procesados. Se realizó la técnica de inmunohistoquímica por flotación siguiendo protocolo descrito por Hoffman y colaboradores en 2016. Los cortes fueron lavados 6 veces por 10 minutos con buffer de fosfato de potasio (KPBS al 0.05 M).

Posterior a los lavados, los tejidos se incubaron en peróxido de hidrógeno al 0.3% en KPBS por 15 minutos. Después de 3 lavados por 10 minutos en KPBS, los cortes se incubaron por 72 horas a 4 °C con una concentración 1:1000 del anticuerpo primario (anti 5-HT7r, Ab61823, Abcam, Cambridge, MA, USA) diluido en 0.4% de Tritón X-100, 3% de suero de caballo en KPBS. Posterior a 6 lavados de 10 minutos en KPBS, los cortes se incubaron por 1 hora a TA con una concentración 1:800 del anticuerpo secundario biotinilado contra conejo hecho en cabra (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) diluido en KPBS con 0.4% de Tritón X-100. Se realizaron 5 lavados de 10 minutos en KPBS.

Una vez lavados los cortes, se incubaron 1 hora con el complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC) con 0.3% de A, 0.3% de B y 0.4% de Tritón Tx100 (Vector

Laboratories, Burlingame, CA, USA). Se realizó una serie de 3 lavados por 10 minutos con KPBS seguido de 3 lavados por 10 minutos en Acetato de Sodio 0.175M antes del revelado con diaminobencidina (Vector, Laboratories, Burlingame, CA, USA). El DAB se preparó con 0.04% de diaminobencidina, 2.5% de nickel (II) y 0.015% de peróxido de hidrógeno al 0.3% en acetato de sodio al 0.175M. Se finalizó con 3 lavados de acetato de sodio por 10 minutos y 3 lavados de KPBS por 10 minutos. Los cortes se montaron en portaobjetos previamente gelatinizados y cubiertos con resina para montar (Permount, Fisher Scientific) junto con el cubre objetos para su posterior análisis. Se cuantificó el número de neuronas inmunopositivas al receptor 5-HT7 en las fases del ciclo estral.

#### **V.IV. Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC)**

En este estudio se utilizó la técnica de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para la cuantificación de los niveles de 5-HT y 5-HIAA en las regiones de amígdala, corteza prefrontal, hipocampo e hipotálamo de un total de 32 ratas hembras divididas en las 4 fases del ciclo estral de tal forma que cada grupo se compuso de 8 sujetos. Una vez que se identificó la fase del ciclo estral de la rata por medio de la citología vaginal se realizó el sacrificio para la recolección de encéfalos, se identificaron las regiones de interés y se almacenaron a -80°C. hasta su procesamiento.

Las muestras a evaluar se obtuvieron del sobrenadante por el método de precipitación de proteínas. En este proceso, las muestras de tejido fresco (reservado a -80 grado centígrados) se sonicaron en ácido perclórico 0.1 M (PCA). El homogenado fue centrifugado a 10,000 rpm durante 20 minutos a 4°C. El sobrenadante obtenido fue cuantificado en el HPLC con detección electroquímica (HPLC-ED). La pastilla (*pellet*) remanente fue disuelto en 500mL de 0.5 M NaOH, y la cuantificación de proteínas se realizó por método de Lowry (BioRad). 5HT y su metabolito 5-HIAA fueron medidos por HPLC-ED. En seguida, una bomba PerkinElmer series 200 (Waltham, MA, USA) fue acoplada a una columna

cromatográfica empaquetada con una adsorbo-esfera de catecolamina (tamaño de partícula de 3 mm, 100 mm x 4.8 mm) (Grace Davison Discovery Sciences, Deerfield, IL, EE. UU.). Se acopló un detector amperométrico Bioanalytical system LC-4C (West Lafayette, IN, EE. UU.) al sistema HPLC. El potencial amperométrico se fijó en 0.850 V en relación con el electrodo de plata/cloruro de plata, y la sensibilidad del detector se ajustó a 5 nA. La fase móvil fue una solución acuosa, isocrática, de fosfato monobásico 0.1 M que contenía 0.5 mM de octilsulfato de sodio, 0.03 mM de EDTA y 12–14% (v/v) de metanol. Los resultados se analizaron con el TotalChrom Navigator versión 6.3.1.0504 (PerkinElmer) y se expresan en ng/mg de proteína del tejido siguiendo protocolo descrito por Rodríguez et al. (2013).

Para establecer una curva de calibración en el HPLC, se preparó una solución patrón de serotonina. Luego, se realizaron diluciones de la solución madre para abarcar el rango de concentraciones esperado. Posteriormente, las muestras preparadas y los estándares fueron analizados en el sistema de HPLC y se registraron los cromatogramas resultantes. De tal forma que, para la cuantificación de la serotonina, se calcularon las áreas de los picos correspondientes en los cromatogramas de las muestras, mientras que para la cuantificación de ácido 5-hidroxiindolacético se determinaron las alturas de los picos. Utilizando la curva de calibración construida previamente, se calculó la concentración de 5-HT y 5-HIAA en las muestras.

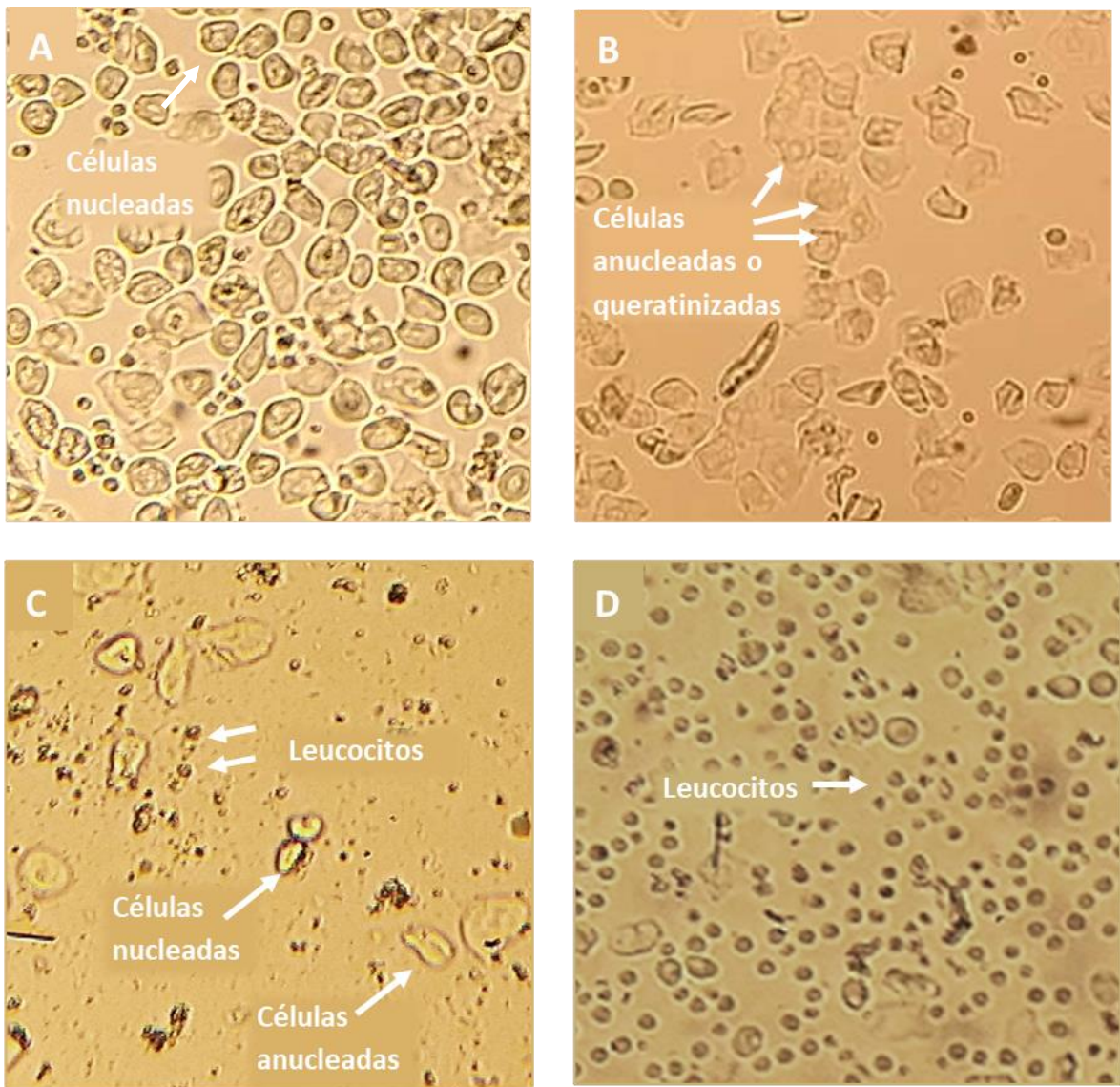
#### **V.V. Procedimientos estadísticos**

Se obtuvieron medias de tendencia central de los grupos, se realizaron pruebas no paramétricas de Kruskal-Willis y U de Mann-Whitney para analizar los datos y determinar la significancia estadística de los resultados obtenidos. Los datos obtenidos fueron analizados con el programa estadístico Graphpad Prism 8.0.2.

## **VI. RESULTADOS**

## **VI.I. Identificación de grupos por citología vaginal**

La citología vaginal permitió la estimación de la fase del ciclo en que se encontraba el animal vivo. Esta técnica, apoyada por la histología al momento del sacrificio, permitió asignar a los animales a sus grupos experimentales hasta ajustar la n=5 por grupo para la histología 5-HT7r y n=8 para cuantificación de serotonina y 5-HIAA por cromatografía. La imagen 3 muestra las fotografías representativas de cada una de las fases del ciclo estral, donde se observa al proestro (A) caracterizado por una mayor concentración de células nucleadas y pocos leucocitos, posteriormente la queratinización del citoplasma da lugar a la degeneración celular dejando células anucleadas o con núcleo fantasma que identifican al estro (B). Una vez que se presentan las células anucleadas comienza el inicio de la filtración leucocitaria en el metaestro (C), donde las células nucleadas aparecerán de forma escasa y las células anucleadas remanentes del estro pueden presentarse, por tanto, el metaestro presenta los tres tipos de células posibles en mayor o menor proporción dependiendo del tiempo de inicio de la fase. Finalmente, en el diestro (D) hay un dominio de la presencia de leucocitos y el aumento de células nucleadas para dar lugar al diestro.

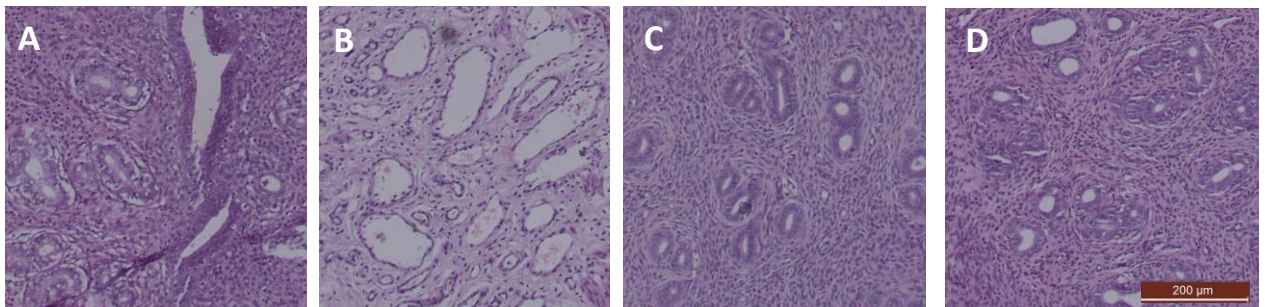


**Imagen 3. Frotis vaginal representativo de las fases del ciclo estral.** A) proestro, caracterizada por numerosas células nucleadas B) estro, donde se identifica un número menor de células nucleadas C) metaestro, con presencia de células nucleadas, anucleadas y leucocitos; y D) diestro, representado por abundantes leucocitos. Datos en concordancia con protocolo descrito por Cora et al., 2015.

## VI.II. Histología del útero

La histología del útero reflejó la fase del ciclo en que estaba cada animal al momento del sacrificio. Esta técnica permitió la asignación adecuada de aquellos animales que *in vivo* presentaron una citología ambigua o que, durante el tiempo de espera para la perfusión, cambiaron de fase.

En la imagen 4 se visualizan glándulas del epitelio de los úteros en cada una de las fases del ciclo, en ellas se puede observar los cambios que muestra el epitelio siguiendo el ciclo estral, de la siguiente manera: El (A) proestro presenta infiltración inflamatoria en el epitelio cuboidal, el (B) estro donde se observa la necrosis del tejido epitelial sin iniciar aún los procesos de mitosis. En el (C) metaestro se observa la formación de nuevas glándulas al mismo tiempo de la pseudoestratificación y mitosis de núcleos por la renovación del epitelio. El (D) diestro se caracteriza por un epitelio columnar recién formado sin estratificación, núcleos centralizados y pocas mitosis con glándulas de mayor tamaño (Westwood, 2008).

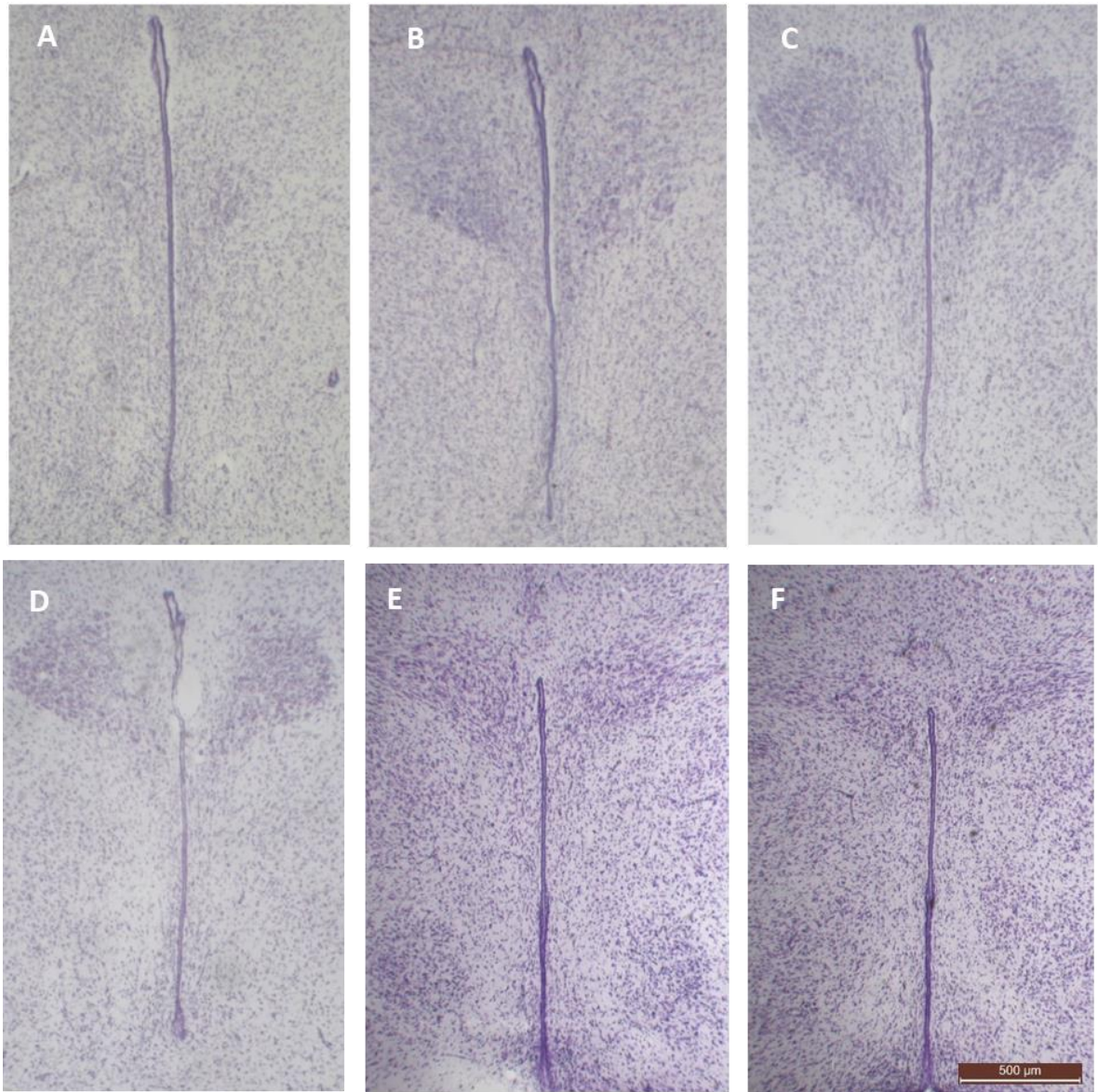


**Imagen 4. Fotografías representativas los cortes del útero teñidas con hematoxilina-eosina. Pueden observarse los cambios presentados por las glándulas uterinas durante las distintas fases del ciclo estral. A) proestro, B) estro, C) metaestro y D) diestro.**

## VI.III. Identificación de Núcleo Paraventricular

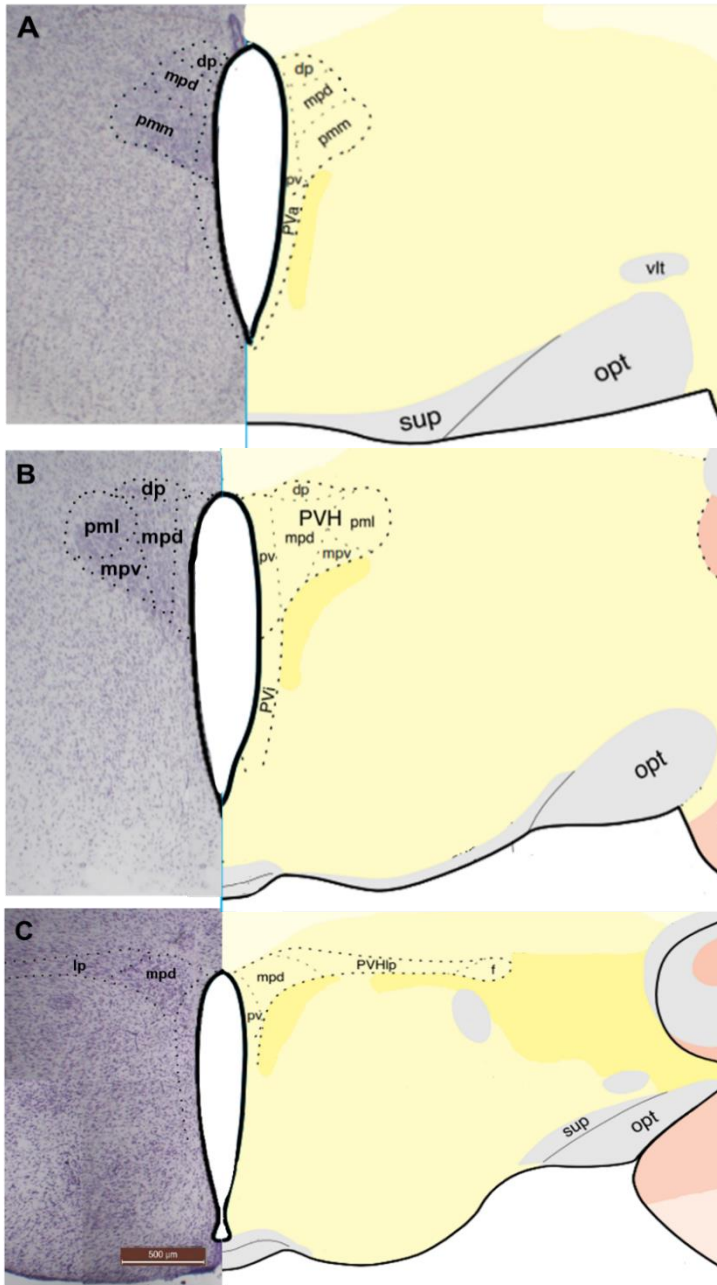
Previo a la selección de los cortes del hipotálamo para su procesamiento con inmunohistoquímica de luz visible, se hicieron cortes coronales secuenciales del NPV. Estos fueron teñidos con violeta de cresilo para la identificación de las referencias anatómicas del NPV. En la imagen 5 se observa el patrón que sigue el

NPV al realizar cortes en el plano coronal de anterior a posterior con referencia al atlas de Paxinos y Watson (2006).



**Imagen 5. Identificación de NPV con violeta de cresilo.** Se muestran cortes coronales de anterior a posterior a partir de A) bregma -0.92 mm, B) -1.30 mm, C) -1.60 mm, D) -1.80 mm, E) -1.88 mm, F) -2.12 mm. Datos en concordancia con atlas de Paxinos y Watson (2006).

En la imagen 6 se observan los cortes anteriores (6.A), así como la región media (6.B) y posterior (6.C) del NPV.

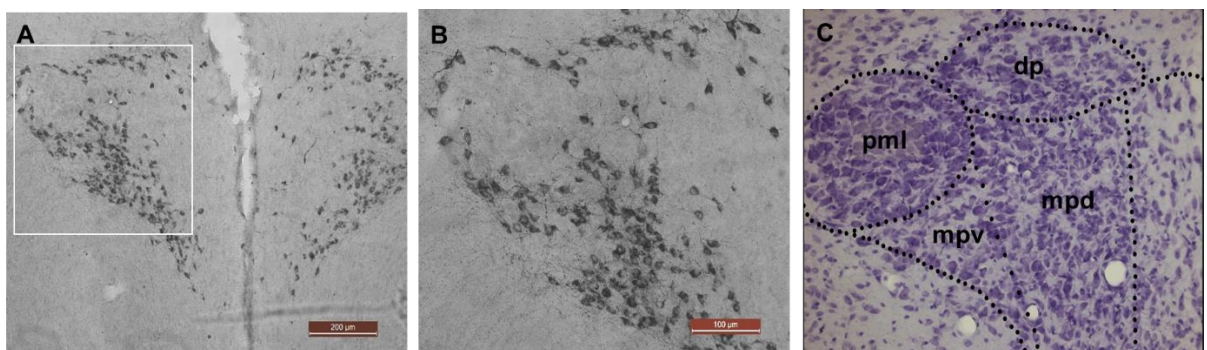


**Imagen 6. Referencias anatómicas de los tres niveles del NPV y sus divisiones.** A) corte anterior, B) corte medio y c) corte posterior acorde a Swanson (2018), obtenidas con violeta de cresilo. dp dorsal parvocelular, pmm magnocelular medial posterior, pml posterior magnocelular, mdp medial parvocelular dorsal, mpv medial parvocelular ventral, opt tractos ópticos.



#### VI.IV. Inmunohistoquímica de receptor 5-HT7 en Núcleo Paraventricular

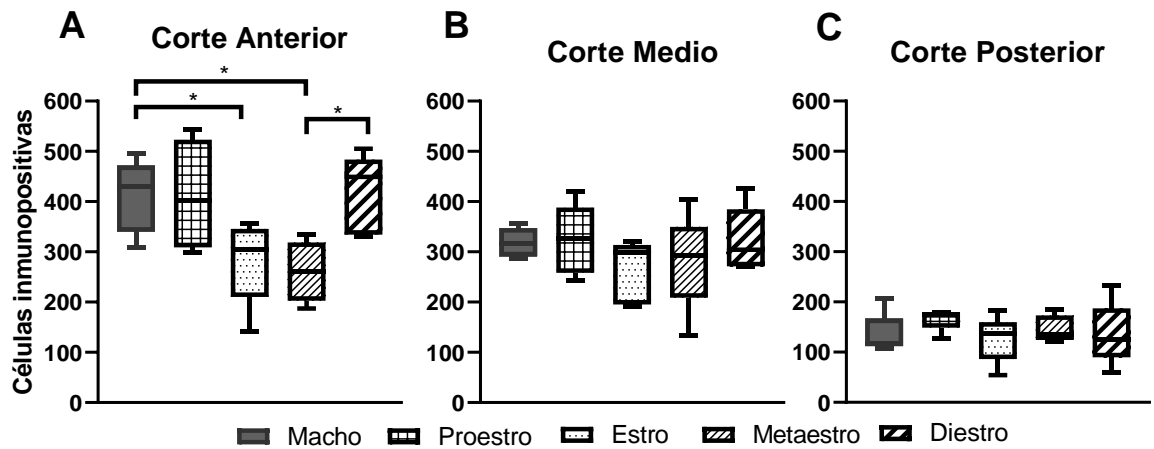
La inmunohistoquímica permitió visualizar las células inmunopositivas de 5-HT7 en núcleo paraventricular. La imagen 7 muestra las neuronas inmunopositivas a receptor 5-HT7 rata macho en un corte medio de NPV, en ella se puede destacar la mayor intensidad de marca en las células parvocelulares en las zonas exteriores del núcleo paraventricular en comparación con las células magnocelulares localizadas en las regiones internas y mediales.



**Imagen 7. Inmunopositividad de 5-HT7r NPV de rata macho.** (Bregma -1.80mm) A) NPV corte medio 4x, B) NPV corte medio 10x y C) NPV con violeta de cresilo dividido en regiones acorde a atlas de Swanson (2018). dp dorsal parvocelular, mdp medial parvocelular dorsal, mpv medial parvocelular ventral, pml posterior magnocelular.

#### VI.V. Conteo celular

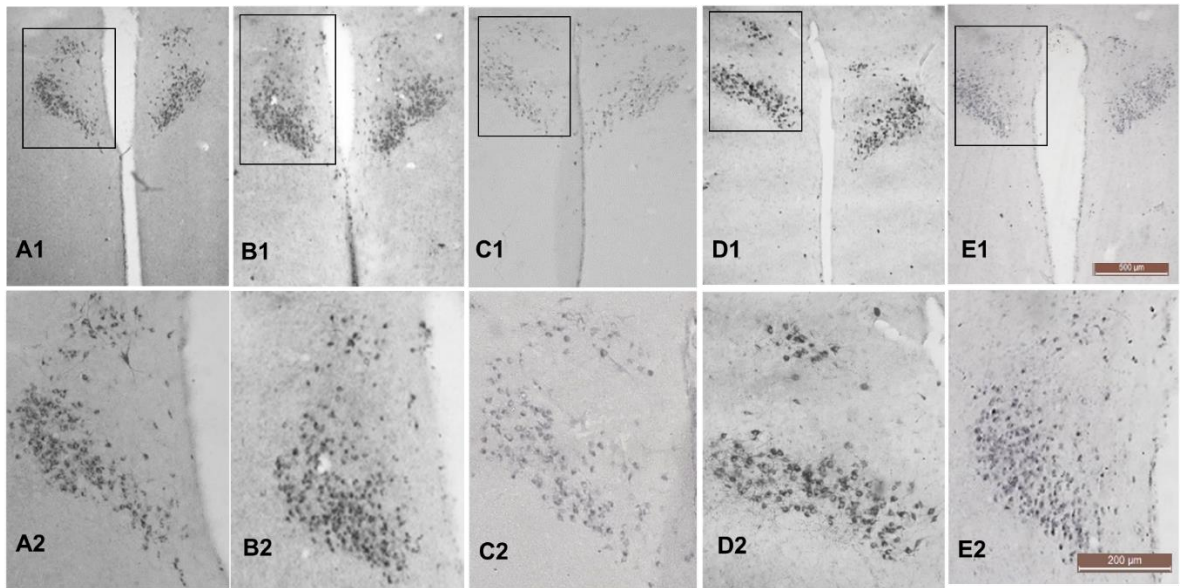
Para el conteo celular, se seleccionaron 3 cortes de cada uno de los 5 animales de los grupos en estudio (n=25). Se eligieron los cortes correspondientes a los niveles representativos de la población neuronal del NPV como sigue: 1) anterior (bregma -1.60mm), 2) medio (bregma -1.80mm) y 3) posterior (bregma -2.00 mm), acorde al atlas de Paxinos y Watson (2006). Se consideraron únicamente las neuronas densamente marcadas, a los resultados obtenidos se les aplicó estadística descriptiva y se hicieron análisis de varianza (ANOVA) no paramétrica, Kruskal-Wallis en busca de diferencias entre grupos, con el paquete estadístico GraphPad Versión 8.0.2 (véase Figura 4).



**Figura 4. Comparación de inmunopositividad a 5-HT7r de NPV en los tres niveles. A) Corte anterior (bregma -1.60mm), b) Corte medio (bregma -1.80mm) y C) Corte posterior (bregma -2.00m).**

#### VI.V. I. Corte anterior

En el corte anterior, se observa que la inmunopositividad al receptor 5-HT7 no es uniforme, si no que se concentra en zonas superiores e inferiores del núcleo que corresponden a las regiones parvocelular dorsal y la magnocelular medial posterior, con poca expresión en la región intermedia que corresponde a la región parvocelular media dorsal (véase Imagen 8).



**Imagen 8. Comparación de la inmunopositividad de 5-HT7r en corte anterior de NPV.** (Bregma -1.60 mm) A1) Macho, B1) proestro, C1) estro, D1) metaestro, E1) diestro y su amplificación; A2) Macho, B2) proestro, C2) estro, D2) metaestro y E2) diestro.

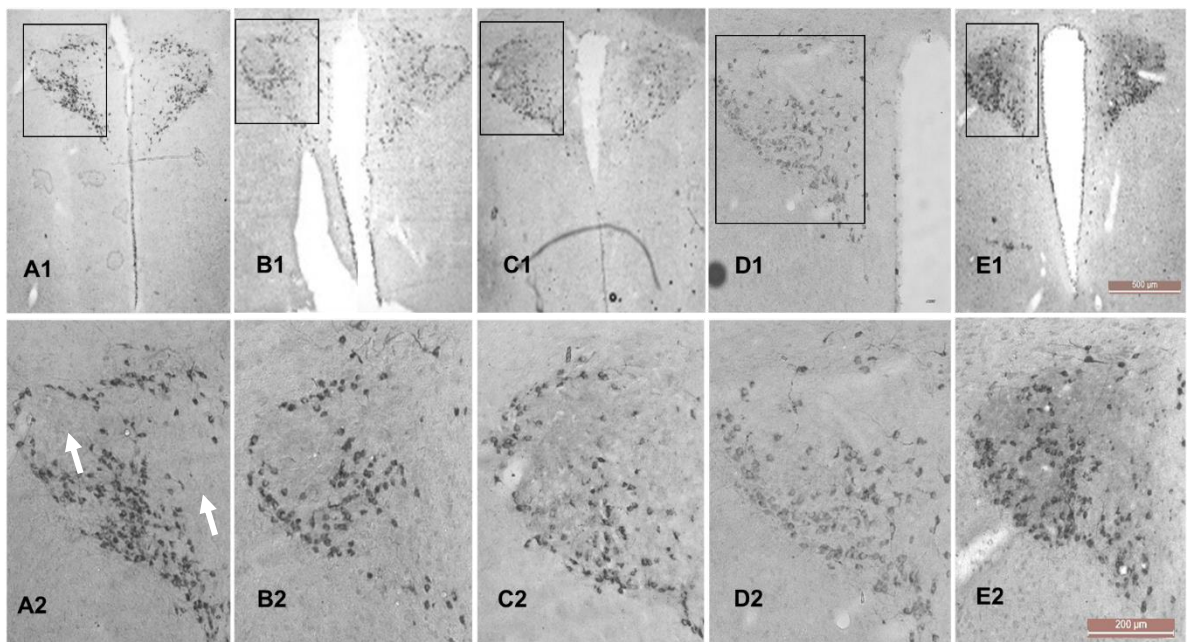
Los conteos del corte anterior arrojaron las siguientes medianas y rangos intercuartiles: macho  $\bar{x}=429$ , IQR=131.5, proestro  $\bar{x}=401$ , IQR=214, estro  $\bar{x}=305$ , IQR=135.5, diestro  $\bar{x}=449$ , IQR=149.5 y metaestro  $\bar{x}=260.5$ , IQR=116. Al aplicar la prueba de Kruskal-Wallis se observaron diferencias significativas entre los grupos [ $H = (4, N = 23) = 10.68, p = 0.0304$ ]. Después se aplicó la prueba U de Mann-Whitney, lo que nos permitió identificar diferencias significativas entre las fases del ciclo estral. En particular, se encontró una diferencia significativa entre el diestro y el metaestro ( $U = 1, p = 0.0317$ ). Además, el macho mostró un número significativamente mayor de células con respecto al estro ( $U = 2, p = 0.0336$ ) y metaestro ( $U = 1, p = 0.0317$ ) (véase Figura 4A).

## VI.V. II. Corte Medio

En el corte medio, se observa que el receptor 5-HT7 presenta una distribución predominante en las regiones parvocelulares del NPV, particularmente en las regiones parvocelular medial ventral y parvocelular dorsal.

La Imagen 9 muestra los cortes medios representativos del NPV con las células inmunopositivas al receptor 5-HT7 de los diferentes grupos evaluados. En ellos, se puede destacar la marca en las regiones correspondientes a las neuronas parvocelulares en que corresponden a regiones: parvocelular medial-ventral y parvocelular dorsal. Se observó escasa inmunopositividad en las regiones magnocelular posterior y parvocelular medial dorsal (véase Imagen 9, flechas blancas).

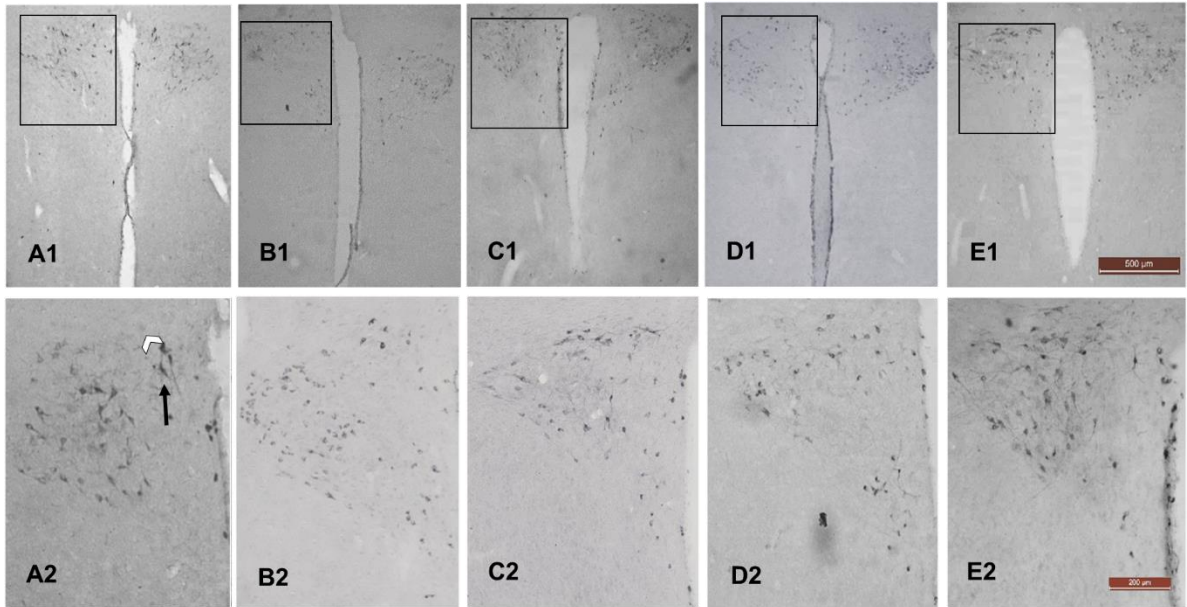
El número de células del corte medio del NPV se analizó con estadística descriptiva, encontrando que los machos presentaron una mediana y rango intercuartil de  $\tilde{x} = 327$ , IQR = 130, mientras que las hembras tuvieron una mediana y rango intercuartil de  $\tilde{x} = 429$ , IQR = 131.5, estro  $\tilde{x} = 299$ , IQR = 118.5, metaestro  $\tilde{x} = 293$ , IQR = 141 y diestro  $\tilde{x} = 304$ , IQR = 113.5. No se encontraron diferencias entre los grupos con la prueba de Kruskal-Wallis [ $H = (5, N = 25) = 2.366, p = 0.6688$ ] (véase Figura 4.B).



**Imagen 9. Comparación de la inmunopositividad de 5-HT7r en corte medio de NPV. Bregma -1.80mm): A1) macho, B1) proestro, C1) estro, D1) metaestro, E1) diestro, y la amplificación del campo en la columna inferior A2) macho, B2) proestro, C2) estro, D2) metaestro y E2) diestro.**

### VI.V. III. Corte Posterior

En el corte posterior, se observa que la distribución del receptor corresponde a las regiones parvocelulares medial dorsal. Se observó inmunopositividad clara en la región parvocelular lateral (véase Imagen 10). Esta señal se observó tenue en comparación con las regiones anterior y media. Dado que la señal era evidente, estas células se consideraron en los conteos.

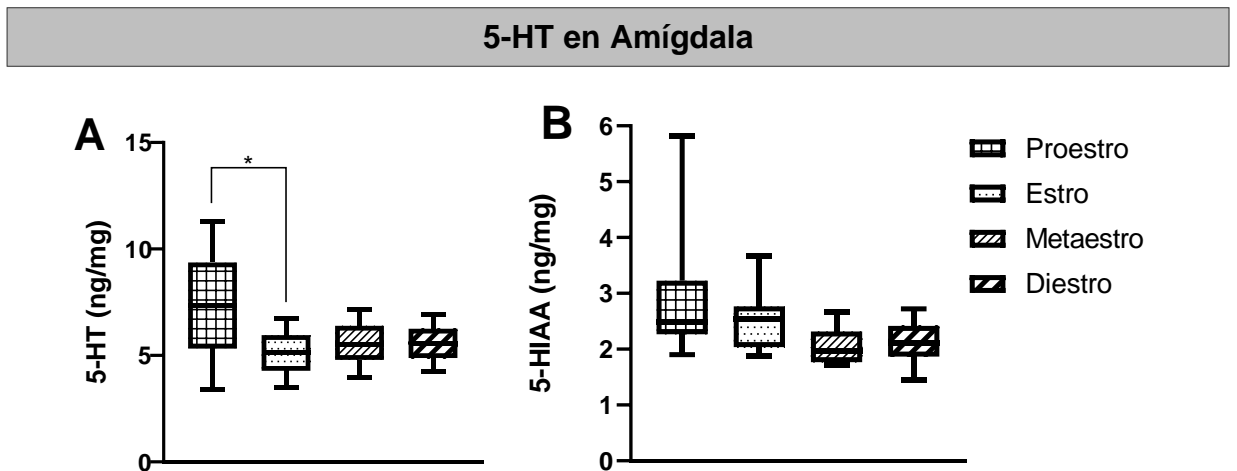


**Imagen 10. Comparación de la inmunopositividad de 5-HT7r en corte posterior de NPV. (Bregma -2.00mm):** A1) macho, B1) proestro, C1) estro, D1) metaestro, E1) diestro, y la amplificación del campo en la columna inferior A2) macho, B2) proestro, C2) estro, D2) metaestro y E2) diestro. Flechas negras muestran las células con marca densa, las cabezas de flecha muestran las células con señal débil (no consideradas en el conteo).

El conteo de las células posteriores fue analizado con estadística descriptiva, arrojando las siguientes medianas y rangos intercuartiles en macho  $\bar{x}=118$  IQR=55, proestro  $\bar{x}= 174$  IQR= 29, estro  $\bar{x}=137$ , IQR=73, metaestro  $\bar{x}=135.5$ , IQR=49.3 y diestro  $\bar{x}=125.5$ , IQR= 97.25. La ANOVA no paramétrica de Kruskal Wallis, denotó la ausencia de diferencias significativas entre los grupos [ $H = (4, N = 25) = 3.293, p = 0.5101$ ] (Figura 4.C).

## VI.VI. Cuantificación de 5-HT y 5-HIAA mediante Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC)

Al realizar el análisis estadístico de los datos obtenidos de la cuantificación de 5-HT y su metabolito ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) se encontraron diferencias significativas entre las fases del ciclo estral en los niveles de serotonina únicamente en la región de amígdala [ $H = (3, N = 32) = 7.901, p = 0.0481$ ] con la prueba de Kruskal-Wallis (Figura 5.A). Al realizar la prueba U de Mann-Whitney, se encontraron diferencias ( $U = 8, p = 0.0104$ ) entre el proestro ( $\bar{x} = 6.84, IQR = 1.725$ ) vs el estro ( $\bar{x} = 4.595, IQR = 1.742$ ). Respecto al metabolito 5-HIAA, se observó una tendencia entre los grupos con la prueba de Kruskal Wallis [ $H = (3, N = 32) = 6.985, p = 0.0724$ ]. (Figura 5.B). Al realizar prueba U de Mann-Whitney al comparar las fases de proestro y metaestro se encontró una diferencia significativa en los niveles de 5-HIAA ( $U = 12.50, p = 0.0399$ ).

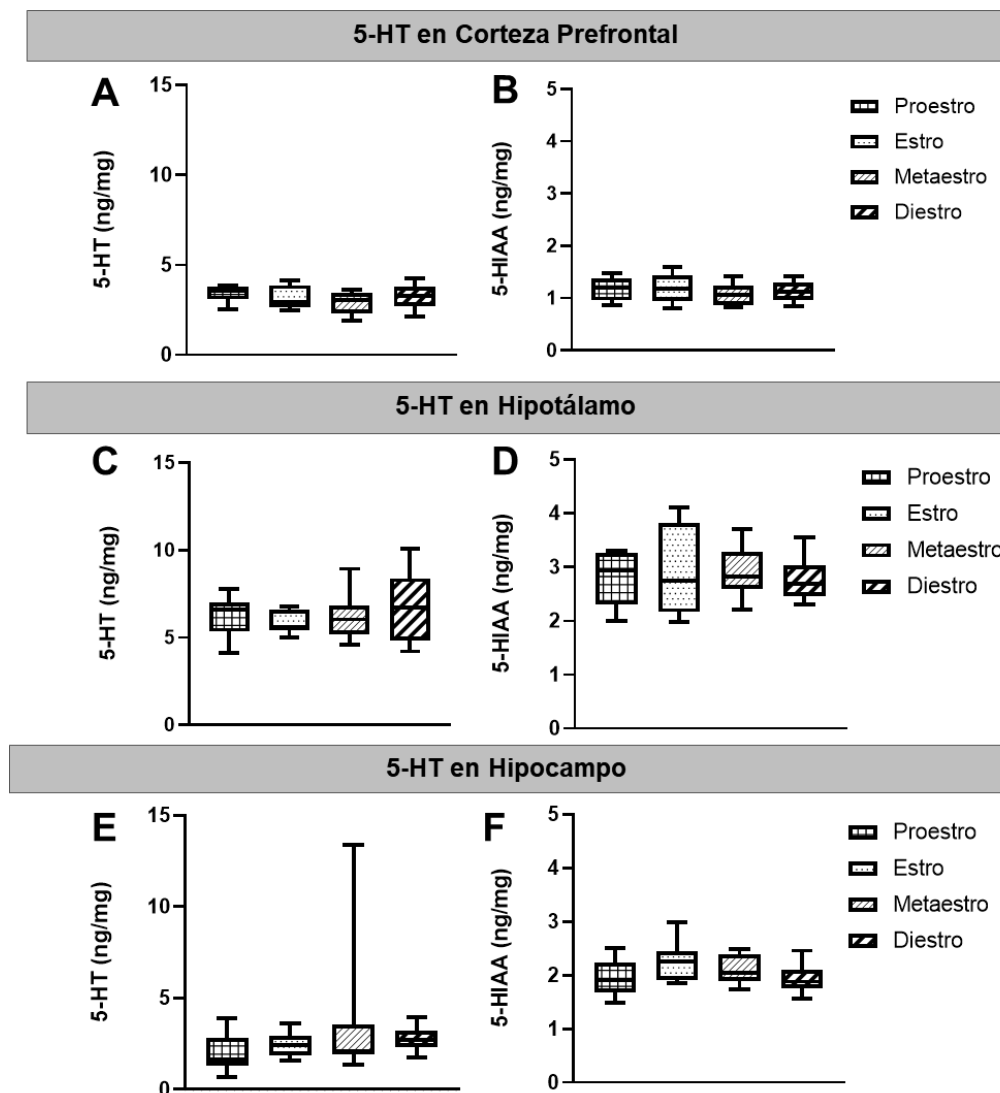


**Figura 5. Concentración de 5-HT y 5-HIAA en amígdala.**

Por otro lado, se aplicó Kruskal-Wallis para analizar los niveles de 5-HT en corteza prefrontal [ $H = (3, N = 32) = 2.773, p = 0.4280$ ], hipotálamo [ $H = (3, N = 32) = 1.129, p = 0.7701$ ] e hipocampo [ $H = (3, N = 32) = 3.382, p = 0.3364$ ]. Sin embargo,

no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratas en las fases del ciclo estral en ninguna de estas regiones (Figura 6).

Mientras tanto, las concentraciones de 5-HIAA en la corteza prefrontal [ $H = (3, N = 32) = 1.387, p = 0.7108$ ), el hipotálamo [ $H = (3, N = 32) = 0.3673, p = 0.9469$ ] e hipocampo [ $H = (3, N = 32) = 3.966, p = 0.2652$ ] tampoco se encontraron diferencias significativas entre los grupos de ratas en las fases del ciclo estral en ninguna de estas regiones cerebrales.



**Figura 6. Comparación de concentraciones de 5-HT y 5-HIAA en corteza prefrontal, hipotálamo e hipocampo.** A) 5-HT y B) 5-HIAA en corteza prefrontal, C) 5-HT y D) 5-HIAA en hipotálamo, E) 5-HT y F) 5-HIAA en hipocampo.

## VII. DISCUSIÓN

En el presente trabajo, se encontró que la expresión de 5-HT<sub>7</sub>r presenta variaciones en la región anterior del NPV durante el ciclo estral en la rata. El número de neuronas que expresaron al receptor 7 fue significativamente menor durante el metaestro comparado con el diestro, y durante el estro comparado con el macho. Butcher et al. (1974) reportó que las fases de metaestro ( $x = 21.2 \pm 2$  pg/mL) y estro ( $x = 25 \pm 2$  pg/ mL) del ciclo, son aquellas que presentan niveles menores de estrógeno de origen ovárico, mientras que las fases de proestro ( $x = 88 \pm 2$  pg/mL) y diestro ( $x = 37.5 \pm 5$  pg/mL) se caracterizan por tener niveles más elevados de estrógeno plasmático (r et al., 1974). Este hallazgo sugiere que, a menores niveles de estrógeno ovárico, la expresión del receptor 7 de serotonina disminuye; mecanismo posiblemente mediado por la regulación de la transcripción por el receptor de estrógeno beta presente en el NPV.

La menor concentración de receptor de serotonina 7 en fases con menores niveles de apoya la noción de que los estrógenos poseen un efecto regulatorio de la expresión de diversos componentes de la neurotransmisión serotoninérgica como la enzima de síntesis cerebro al TPH2, SERT, monoamino oxidasa B (Chevillard et al., 1981), así como de algunos receptores como el 5-HT<sub>1A</sub>. Por ejemplo, McQueen et al. (1997), reportaron que la administración de 17-beta-estradiol en ratas ovariectomizadas incremento la expresión del ARNm de SERT en el núcleo del rafé dorsal, así como la unión del SERT con la serotonina en regiones como el septum lateral, amígdala basolateral, núcleo ventral del tálamo y núcleo ventromedial del hipotálamo. Otros grupos de investigación han reportado en este sentido que, la administración de 17-beta-estradiol incrementó la expresión de SERT y del receptor 5-HT<sub>2A</sub> en el rafé dorsal y prosencéfalo, regiones involucradas con el control del estado de ánimo, estado mental y cognición en ratas ovariectomizadas; efecto que fue bloqueado por el antagonista estrogénico Tamoxifen (Sumner et al., 1999).



Algunos trabajos han documentado que el estrógeno incrementa la expresión de otros receptores como el 5-HT<sub>1A</sub> en la rata ovariectomizada en áreas límbicas como la amígdala medial, corteza piriforme y corteza perirrinal, mientras que otras como el hipocampo no son afectadas (Osterlund y Hurd, 1998). En esta última región, otros autores han reportado que al administrar 17-beta estradiol a ratas ovariectomizadas, la expresión del ARNm receptor 5-HT<sub>1A</sub> redujo en un 20% en el giro dentado y capa CA<sub>2</sub>; mientras que, al administrar estrógeno en combinación con progesterona, la expresión del receptor 5-HT<sub>1A</sub> incrementó hasta un 30% en las regiones CA<sub>1</sub> y CA<sub>2</sub> del hipocampo dorsal (Birzniece et al., 2001). Cabe destacar que, la ovariectomía seguida de reemplazo estrogénico es un modelo ampliamente utilizado en el estudio de los efectos de los estrógenos en diversos órganos, como el cerebro. Sin embargo, pocos trabajos consideran el efecto de otras hormonas ováricas como la progesterona sobre la regulación de diversos sistemas.

Desde el punto de vista funcional se ha reportado que posterior a 14 días, la ovariectomía disminuye la sensibilidad del receptor 5-HT<sub>1A</sub> en el hipotálamo, reflejado por el incremento en la liberación de ACTH; este efecto es revertido por el reemplazo estrogénico (Raap et al., 2002). Poco se sabe respecto a la regulación que podrían ejercer los estrógenos sobre otros receptores de serotonina presentes en el PVN como el 5-HT<sub>2A</sub>, 5-HT<sub>2C</sub> o 5-HT<sub>7</sub> (Bagdy, 1996), involucrados en el control del eje HPA.

Por otra parte, se conoce que el NPV posee una población heterogénea de neuronas que algunos autores describen como las regiones magnocelular (con neuronas secretoras grandes) que expresan OT y AVP, y que son primordialmente células que proyectan a regiones autonómicas como el núcleo del tracto solitario, núcleo dorsal del nervio vago, así como a la médula espinal (Nilaver et al., 1980); y la población de neuronas parvocelulares (más pequeñas) que expresan CRH, AVP y OT, que pueden o no proyectar a la pituitaria (Sawchenko y Swanson, 1982). En otros trabajos, se identifica a las regiones del NPV con técnicas de

inmunohistoquímica acorde a los niveles rostrocaudales en el plano coronal tomados a partir de bregma (Sladek et al., 2015); esta clasificación corresponde a la utilizada en el presente trabajo. Acorde al fenotipo y nivel, pueden identificarse poblaciones de neuronas distribuidas de la siguiente manera: 1) neuronas oxitocinérgicas y preautonómicas en el nivel anterior, 2) neuronas oxitocinérgicas, vasopresinérgicas y preautonómicas en el nivel medio y 3) neuronas preautonómicas en el nivel posterior (con expresión de CRH) en la parte medial del NPV.

En este trabajo se encontró que el receptor 5-HT7 presenta una distribución predominante en las regiones parvocelulares del NPV, particularmente en las regiones parvocelular medial ventral y parvocelular dorsal que, según Qin et al. (2018) se encargan de la liberación de CRH, TRH y somatostatina. Otros autores han reportado que esta misma región albergan al 61% de neuronas que liberan a la CRH (Melnick et al., 2020, Feetham et al., 2018), en concordancia con la regulación del eje HPA descrita por Herman et al. (2016). La población parvocelular dorsal se caracteriza por presentar el 36% de neuronas positivas para OT y tener robustas proyecciones hacia regiones autonómicas para la activación el sistema simpático como el tronco encefálico y la medula espinal esto ayuda activar el eje HPA (Melnick et al., 2020).

Dado que en la expresión del receptor 5-HT7 se encontró preponderantemente en las neuronas parvocelulares medial ventral y dorsal, y que las diferencias se encontraron en el nivel anterior con un número menor de células en las fases con menores niveles de estradiol (estro y metaestro), se sugiere que las neuronas que regulan a la baja al 5-HT7r por estrógeno, corresponden a una población que libera OT y preautonómicas de ese nivel. Más estudios se requieren para elucidar este concepto.

Resulta interesante el hecho que no se encontraron diferencias en el número de neuronas positivas al receptor 5-HT7 entre los machos y las hembras en las

fases de alta concentración de estrógeno plasmático (proestro y diestro), ni en los niveles medio y posterior del NPV. Este hallazgo sugiere que sólo poblaciones específicas de neuronas en el nivel anterior son sensibles a las oscilaciones de los estrógenos para la expresión del receptor 7 de serotonina. Más experimentos se requieren para aclarar esta noción.

Además, existen múltiples factores que pueden contribuir a las diferencias observadas en la inmunopositividad de los 5-HT7r entre machos y hembras y su relación con el funcionamiento dimórfico del eje HPA. Estos factores incluyen la acción de otras hormonas esteroideas además del estradiol como la testosterona y la progesterona. Se ha descrito que la testosterona en ratas orquiectomizadas disminuye los niveles de ACTH y corticosterona comparada con el tratamiento con estrógenos (Lund et al., 2004). En tanto, otros autores han reportado que la progesterona ejerce un efecto ansiogénico, posiblemente mediado a través de la regulación de receptores GABAérgicos en la región peri-paraventricular (Lovick et al., 2012; González-Jatuff et al., 2012).

Otros trabajos han reportado que el receptor 5-HT7 disminuye su expresión como resultado de la exposición a estrés crónico en la rata macho (García- Iglesias et al., 2013), concomitante a una sensibilización del eje HPA. Este estudio plantea la idea que la disminución de receptores de serotonina como el 5-HT7r podría ser una consecuencia de un eje HPA más activo en lugar de su causa. En este contexto, un eje HPA más activo, como el observado en las hembras, con una mayor liberación de corticosterona, podría llevar a la reducción de receptores de serotonina como el 5HT7r, como se observa en los machos expuestos a estrés crónico.

Contrario a lo esperado, no se encontraron diferencias en el nivel de serotonina o 5-HIAA en el hipotálamo, región de localización del NPV asociado a las variaciones de estrógeno durante el ciclo estral. Tampoco se encontraron diferencias en regiones relacionadas con la regulación del eje como la corteza prefrontal ni el hipocampo; sin embargo, en este trabajo encontramos que el nivel

de serotonina muestra una disminución significativa en la amígdala en el estro (fase con bajo nivel de estrógeno) comparado con el proestro (con nivel alto de estrógeno). Asimismo, 5-HIAA redujo su concentración en la fase de metaestro (con baja nivel de estrógeno) comparada con el proestro.

Algunos estudios han documentado cambios en el nivel de serotonina y otros neurotransmisores como dopamina y noradrenalina en el hipotálamo durante el desarrollo postnatal (Macho et al., 1986) en machos y hembras (Lesage et al., 1996). Sin embargo, existen escasos reportes del nivel de serotonina en el hipotálamo durante el ciclo estral de la rata (Babichev y Adamskaya, 1976). En estos trabajos, se reporta que los mayores cambios ocurren en el núcleo arcuato y región premamilar del hipotálamo.

Este hallazgo sugiere que la serotonina podría regular la actividad del eje HPA en relación con los niveles de estrógeno, a través de su acción en regiones límbicas como la amígdala.

### **Limitantes del estudio**

La presente investigación ha arrojado luz sobre idea de que la regulación de la expresión de los receptores serotoninérgicos por estrógeno es dinámica. Nuestro trabajo da pie para investigaciones posteriores, donde se sugiere la inclusión de pruebas conductuales y funcionales, a fin de comprender mejor las implicaciones que la expresión diferencial de los receptores serotoninérgicos o los cambios estrogénicos podría relacionarse con procesos como el estado de ánimo y cognición, así como el desarrollo de trastornos afectivos.

Asimismo, se alienta a futuras investigaciones a determinación de los niveles de CRH y corticosterona, durante el ciclo estral en la rata; ya que esto permitiría abrir luz ante las inconsistencias que se presentan en la literatura, donde algunos autores reportan al estrógeno como inhibidor del eje HPA (Cleber Gama de Barsellos Filho et al., 2021; Brinton et al., 2015), mientras otros lo describen como potenciador

(Hernández-Hernandez, 2019; Goel et al., 2014). Así mismo, se sugiere atender el papel que desempeñan las fluctuaciones de la progesterona durante el ciclo estral y explorar la regulación de los receptores de serotonina en otras regiones cerebrales que proyectan y regulan al eje HPA.

## **VIII. CONCLUSIÓN**

En este trabajo, se exploró la relación entre la expresión del receptor de serotonina 7 en el núcleo paraventricular del hipotálamo a lo largo del ciclo estral en la rata. La expresión de 5-HT7r se encontró de manera predominante, en la población de células parvocelulares de los niveles anterior, medio y posterior del NPV. Acorde a lo reportado por la literatura, esta población tiene un fenotipo heterogéneo ya que incluye neuronas neurosecretoras de CRH y OT (a la par de otras hormonas como TRH y somatostatina), así como neuronas que proyectan preautonómicas que proyectan al tallo cerebral y médula espinal. El conteo de las células inmunopositivas a 5-HT7r mostró que las células del nivel anterior del NPV reducen su número en el estro y metaestro, fases con bajo nivel de estrógeno. En el nivel anterior, no se encontró diferencia en el número de células que expresan 5-HT7r entre los machos y las fases del ciclo con alto nivel de estrógeno (proestro y diestro). Tampoco hubo diferencias entre sexos en la expresión del receptor 7 en los niveles medio y posterior entre sexos. Estos resultados sugieren que sólo una población específica de células parvocelulares del nivel anterior que, por reportes en la literatura, corresponde a neuronas oxitocinérgicas y preautonómicas, responde de manera diferencial a las oscilaciones en los niveles de estrógeno.

Los resultados de la cromatografía, arrojaron que no existen diferencias en la concentración de serotonina o su metabolito 5-HIAA en el hipotálamo, corteza cerebral e hipocampo; regiones involucradas con procesamiento de la respuesta de estrés. Sin embargo, es relevante el hallazgo de la disminución del nivel serotonina y 5-HIAA en la amígdala durante el estro y metaestro, respectivamente. Estas fases presentan niveles bajos de estrógeno, por lo que se sugiere que la actividad del eje

HPA, que se encuentra aumentado en la hembra, podría estar influida por la serotonina a través de receptores localizados en regiones límbicas asociadas al control emocional y la cognición.

Finalmente, nuestro trabajo ha contribuido a considerar aspectos clave de la regulación serotoninérgica en el cerebro, así como su relevancia para la función neurobiológica y el comportamiento. Nuestros hallazgos ofrecen un punto de partida valioso para futuras investigaciones. La inclusión de pruebas conductuales, como evaluaciones de ansiedad y depresión, podría proporcionar una comprensión más completa de los mecanismos por los que la neurotransmisión serotoninérgica en diversos niveles del eje HPA, se traducen en el comportamiento. Además, la investigación en otros modelos animales y en humanos podría arrojar luz en el entendimiento de la interacción entre los estrógenos y la serotonina en los procesos regulatorios de estrés en condiciones fisiológicas y patológicas.

## IX. BIBLIOGRAFIA

- Albert, P. (2015). Why is depression more prevalent in women?. *Journal of Psychiatry & Neuroscience*, 40(4), 219–221. DOI:10.1503/jpn.150205.
- Ajayi, A. F. y Akhigbe, R. E. (2020). Staging of the estrous cycle and induction of estrus in experimental rodents: an update. *Fertility Research and Practice*, 6(1). DOI: 10.1186/s40738-020-00074-3.
- Babb, J. A., Masini, C. V., Day, H. E. y Campeau, S. (2013). Sex differences in activated corticotropin-releasing factor neurons within stress-related neurocircuitry and hypothalamic-pituitary-adrenocortical axis hormones following restraint in rats. *Neuroscience*, 234, 40–52. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2012.12.051.
- Babichev, V. N., y Adamskaya, E. I. (1976). Changes in monoamine content in various regions of the hypothalamus in different stages of the estrous cycle. *Neuroscience and behavioral physiology*, 7(3), 206–211. DOI: 10.1007/BF01186054
- Bagdy G. (1996). Role of the hypothalamic paraventricular nucleus in 5-HT<sub>1A</sub>, 5-HT<sub>2A</sub> and 5-HT<sub>2C</sub> receptor-mediated oxytocin, prolactin and ACTH/corticosterone responses. *Behavioural Brain Research*, 73(1-2), 277–280. DOI: 10.1016/0166-4328(96)00112-x.
- Birzniece, V., Johansson, I. M., Wang, M. D., Seckl, J. R., Bäckström, T., & Olsson, T. (2001). Serotonin 5-HT<sub>1A</sub> receptor mRNA expression in dorsal hippocampus and raphe nuclei after gonadal hormone manipulation in female rats. *Neuroendocrinology*, 74(2), 135–142. DOI: 10.1159/000054679.
- Borbély, É., Simon, M., Fuchs, E., Wiborg, O., Czéh, B. y Helyes, Z. (2022) Novel drug developmental strategies for treatment-resistant depression. *British journal of pharmacology*, 179(6), 1146–1186. DOI: 10.1111/bph.15753.

- Brinton, R. D., Yao, J., Yin, F., Mack, W. J., y Cadenas, E. (2015). Perimenopause as a neurological transition state. *Nature Reviews Endocrinology*, 11(7), 393–405. DOI:10.1038/nrendo.2015.82.
- Butcher, R. L., Collins, W. E., y Fugo, N. W. (1974). Plasma concentration of LH, FSH, Prolactin, Progesterone and Estradiol-17 $\beta$  throughout the 4-day estrous cycle of the rat. *Endocrinology*, 94(6), 1704–1708. DOI:10.1210/endo-94-6-1704.
- Butterworth J.F., Mackey D.C. y Wasnick J.D (2018). *Morgan y Mikhail's Clinical Anesthesiology*, 6e. McGraw-Hill; New York, NY, USA: 2018. [(accessed on 18 June 2021)].
- Carroll, B.J., Cassidy, F., Naftolowitz, D., Tatham, N.E., Wilson, W.H., Iranmanesh, A., Liu, P.Y. y Veldhuis, J.D. (2007), Pathophysiology of hypercortisolism in depression. *Acta Psychiatrica Scandinavica*, 115: 90-103. DOI:10.1111/j.1600-0447.2007.00967.x.
- Chevillard, C., Barden, N. y Saavedra, J. M. (1981). Estradiol treatment decreases type A and increases type B monoamine oxidase in specific brain stem areas and cerebellum of ovariectomized rats. *Brain research*, 222(1), 177–181. DOI: 10.1016/0006-8993(81)90955-0.
- Cleber Gama de Barcellos Filho, P., Campos Zanelatto, L., Amélia Aparecida Santana, B., Calado, R. T. y Rodrigues Franci, C. (2021). Effects chronic administration of corticosterone and estrogen on HPA axis activity and telomere length in brain areas of female rats. *Brain Research*, 1750, 147152. DOI: 10.1016/j.brainres.2020.147152.
- Cora, M., Kooistra, L., y Travlos, G. (2015). Vaginal cytology of the laboratory rat and mouse. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776–793. DOI: 10.1177/0192623315570339.
- De Lima, X., Hanekamp, S. y Simonyan, K. (2019) Sexual dimorphism within brain regions controlling speech production. *Frontiers in Neuroscience*. 2019; 13 (795). DOI: 10.3389/fnins.2019.00795.



- De Nicola, A., Saravia, F., Beauquis, J., Pietranera, L., y Ferrini, M. (2006). Estrogens and neuroendocrine hypothalamic-pituitary-adrenal axis function. *pituitary today: Molecular, physiological and clinical aspects*, 157–168. DOI: 10.1159/000094324.
- Donner, N., y Handa, R. J. (2009). Estrogen receptor beta regulates the expression of tryptophan-hydroxylase 2 mRNA within serotonergic neurons of the rat dorsal raphe nuclei. *Neuroscience*, 163(2), 705–718. DOI: 10.1016/j.neuroscience.2009.06.046.
- Donner, N. C., y Lowry, C. A. (2013). Sex differences in anxiety and emotional behavior. *European Journal of Physiology*, 465(5), 601–626. DOI:10.1007/s00424-013-1271-7.
- Evanson, N. y Herman, J. (2015). Role of paraventricular nucleus glutamate signaling in regulation of HPA axis stress responses. *Interdisciplinary Information Sciences*, 21(3), 253–260. DOI: 10.4036/iis.2015.b.10.
- Fanson, K., Keeley, T. y Fanson, B. (2014). Cyclic changes in cortisol across the estrous cycle in parous and nulliparous asian elephants. *Endocrine Connections*, 3(2), 57–66. DOI: 10.1530/ec-14-0025.
- Feetham, C. H., O'Brien, F., y Barrett-Jolley, R. (2018). Ion Channels in the Paraventricular Hypothalamic Nucleus (PVN); Emerging Diversity and Functional Roles. *Frontiers in Physiology*, 9. DOI: 10.3389/fphys.2018.00760.
- Fernández, T., Suárez G. y Clapés, S. (2021). Protocolo para la citología vaginal directa de ratas de laboratorio. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 20(3).
- Feuchtl, A., Bagli, M., Stephan, R., Frahnert, C., Kölsch, H., Kühn, K. U. y Rao, M. L. (2004). Pharmacokinetics of m-Chlorophenylpiperazine after intravenous and oral administration in healthy male volunteers: Implication for the pharmacodynamic profile. *Pharmacopsychiatry*, 37(4), 180–188. DOI: 10.1055/s-2004-827175.
- Fuente-Martin, E., Garcia-Caceres, C., Morselli, E., Clegg, D. J., Chowen, J. A., Finan, B. y Tschöp, M. (2013). Estrogen, astrocytes and the neuroendocrine

- control of metabolism. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 14(4), 331–338. DOI:10.1007/s11154-013-9263-7.
- Fuentes, N., y Silveyra, P. (2019). Estrogen receptor signaling mechanisms. *Advances in Protein Chemistry and Structural Biology*. DOI: 10.1016/bs.apcsb.2019.01.001.
  - García-Iglesias, B., Mendoza-Garrido, M., Gutiérrez-Ospina, G., Rangel-Barajas, C., Noyola-Díaz, M., y Terrón, J. (2013). Sensitization of restraint-induced corticosterone secretion after chronic restraint in rats: Involvement of 5-HT7 receptors. *Neuropharmacology*, 71, 216–227. DOI: 10.1016/j.neuropharm.2013.03.013.
  - Di Giovanni, G., Chagraoui, A., Bharatiya, R., y De Deurwaerdère, P. (2020). Serotonergic control of excitability: From neuron to networks. *Handbook of the Behavioral Neurobiology of Serotonin*, 197–215. DOI:10.1016/b978-0-444-64125-0.00010-4
  - Gambino, Y. P., Maymó, J. L., Pérez Pérez, A., Calvo, J. C., Sánchez-Margalet, V., y Varone, C. L. (2012). Elsevier Trophoblast Research Award Lecture: Molecular mechanisms underlying estrogen functions in trophoblastic cells – Focus on leptin expression. *Placenta*, 33, S63–S70. DOI: 10.1016/j.placenta.2011.12.001
  - Gómez Ordóñez, S., Gutiérrez Álvarez, Á. M., y Valenzuela Plata, E. L. (2007). Corticoides: 60 años después, una asignatura pendiente. *Revista Ciencias de la Salud*, 5(3), 58-69.
  - Goel, N., Workman, J., Lee, T., Innala, L. y Viau, V. (2014). Sex differences in the HPA axis. *Comprehensive Physiology*, 1121-1155. DOI: 10.1002/cphy.c130054
  - Gordon, J., Desaix, P., Johnson, E., Johnson, J., Korol, O., y Kruse, D. (2017). *Anatomy and Physiology*. Openstax. Retrieved 5 May 2021, from <https://openstax.org/details/books/anatomy-and-physiology>.
  - González-Jatuff, A. S., Torrecilla, M., Quercetti, M., Zapata, M. P., & Rodríguez Echandía, E. L. (2012). Influence of the estrous cycle on some non reproductive

behaviors and on brain mechanisms in the female rat. *Interdisciplinaria*, 29(1), 63-77.

- Haleem D. J. (2022). Glucocorticoids in the physiological and transcriptional regulation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor and the pathogenesis of depression. *The Neuroscientist: A review journal bringing neurobiology, neurology and psychiatry*, 28(1), 59–68. DOI: 10.1177/1073858420975711.
- Hamidovic, A., Karapetyan, K., Serdarevic, F., Choi, S.H., Eisenlohr-Moul, T. y Pinna, G. (2020) Higher circulating cortisol in the follicular vs. luteal phase of the menstrual cycle: A meta-analysis. *Frontiers in Endocrinology*. 11:311. DOI: 10.3389/fendo.2020.00311
- Handa, R., Mani, S. y Uht, R. (2012) Estrogen receptors and the regulation of neural stress responses. *Neuroendocrinology*. 2012;96(2):111-8. DOI: 10.1159/000338397.
- Handa, R. y Weiser, M. (2014). Gonadal steroid hormones and the Hypothalamo–Pituitary–Adrenal axis. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 35(2), 197–220. DOI: 10.1016/j.yfrne.2013.11.001.
- Heck, A. y Handa, R. (2019) Sex differences in the hypothalamic–pituitary–adrenal axis response to stress: An important role for gonadal hormones. *Neuropsychopharmacology* 44, 45–58 (2019). DOI: 10.1038/s41386-018-0167-9.
- Heisler, L., Pronchuk, N., Nonogaki, K., Zhou, L., Raber, J., Tung, L. y Tecott, L. H. (2007). Serotonin activates the hypothalamic-pituitary-adrenal axis via serotonin 2C receptor stimulation. *Journal of Neuroscience*, 27(26), 6956–6964. DOI:10.1523/jneurosci.2584-06.2007.
- Heldring, N., Pike, A., Andersson, S., Matthews, J., Cheng, G., Hartman, J. y Gustafsson, J.-Å. (2007). Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiological Reviews*, 87(3), 905–931. DOI: 10.1152/physrev.00026.2006.
- Herman, J.P., McKlveen, J.M., Ghosal, S., Kopp, B., Wulsin, A., Makinson, R., Scheimann, J., y Myers, B. (2016) Regulation of the Hypothalamic-Pituitary-

Adrenocortical Stress Response. *Comprehensive Physiology*. 2016 Mar 15;6(2):603-21. DOI: 10.1002/cphy.c150015.

- Hernández-Hernández, O. T., Martínez-Mota, L., Herrera-Pérez, J., y Jiménez-Rubio, G. (2019). Role of estradiol in the expression of genes involved in serotonin neurotransmission: implications for female depression. *Current Neuropharmacology*, 17(5), 459–471. DOI: 10.2174/1570159X16666180628165107.
- Hewitt, S. y Korach, K. (2018). Estrogen receptors: New directions in the new millennium. *Endocrine Reviews*, 39(5), 664–675. DOI:10.1210/er.2018-00087.
- Hoffman, G. E., Murphy, K. J., y Sita, L. V. (2016). The importance of titrating antibodies for immunocytochemical methods. *Current Protocols in Neuroscience*, 76(1), 2.12.1–2.12.37. doi:10.1002/cpns.1
- Hoffman, M. y Swaab, D. (1991) Sexual dimorphism of the human brain: Myth and reality. *Experimental and Clinical Endocrinology & Diabetes*, 98(05), 161–170. DOI: 10.1055/s-0029-1211113.
- Holmes, M., Di Renzo, G., Beckford, U., Gillham, B., y Jones, M. (1982). Role of serotonin in the control of secretion of corticotrophin releasing factor. *Journal of Endocrinology*, 93(2), 151–160. DOI: 10.1677/joe.0.0930151.
- Hori, D., Tsujiguchi, H., Kambayashi, Y., Hamagishi, T., Kitaoka, M., Mitoma, J., y Nakamura, H. (2016). The associations between lifestyles and mental health using the General Health Questionnaire 12-items are different dependently on age and sex: a population-based cross-sectional study in Kanazawa, Japan. *Environmental Health and Preventive Medicine*, 21(6), 410–421. DOI: 10.1007/s12199-016-0541-3.
- Hori, T., Nakashima, T., Koga, H., Kiyohara, T. y Inoue, T. (1988). Convergence of thermal, osmotic and cardiovascular signals on preoptic and anterior hypothalamic neurons in the rat. *Brain Research Bulletin*, 20(6), 879–885. DOI: 10.1016/0361-9230(88)90105-0.
- Isgor, C., Cecchi, M., Kabbaj, M., Akil, H., y Watson, S. (2003) Estrogen receptor beta in the paraventricular nucleus of hypothalamus regulates the

- neuroendocrine response to stress and is regulated by corticosterone. *Neuroscience*. 2003;121(4):837-45. DOI: 10.1016/s0306-4522(03)00561-x.
- Jørgensen, H., Knigge, U., Kjaer, A., Møller, M., y Warberg, J. (2002). Serotonergic Stimulation of Corticotropin-Releasing Hormone and Pro-Opiomelanocortin Gene Expression. *Journal of Neuroendocrinology*, 14(10), 788–795. DOI:10.1046/j.1365-2826.2002.00839.x.
  - Kant, G., Lenox, R., Bunnell, B., Mougey, E., Pennington, L., y Meyerhoff, J. (1983). Comparison of stress response in male and female rats: Pituitary cyclic AMP and plasma prolactin, growth hormone and corticosterone. *Psychoneuroendocrinology*, 8(4), 421–428. DOI:10.1016/0306-4530(83)90021-5
  - Kraan, G. P. B., Dullaart, R. P. F., Pratt, J. J., Wolthers, B. G., Drayer, N. M., y de Bruin, R. (1998). The daily cortisol production reinvestigated in healthy men. The serum and urinary cortisol production rates are not significantly different. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 83(4), 1247–1252. DOI:10.1210/jcem.83.4.4694.
  - Krishnan, V. y Nestler, E. J. (2011). Animal Models of Depression: Molecular Perspectives. *Current Topics in Behavioral Neurosciences*, 121–147. DOI: 10.1007/7854\_2010\_108
  - Kuehner, C. (2017). Why is depression more common among women than among men?. *The Lancet Psychiatry*, 4(2), 146–158. DOI:10.1016/s2215-0366(16)30263-2.
  - Lanfumey, L., Mongeau, R., Cohen-Salmon, C., y Hamon, M. (2008) Corticosteroid-serotonin interactions in the neurobiological mechanisms of stress-related disorders. *Neuroscience and Biobehavioral Reviews*. 2008 Aug;32(6):1174-84. DOI: 10.1016/j.neubiorev.2008.04.006.
  - Lee, D. Y., Kim, E., & Choi, M. H. (2015). Technical and clinical aspects of cortisol as a biochemical marker of chronic stress. *Biochemistry and Molecular Biology Reports*, 48(4), 209–216. DOI:10.5483/bmbrep.2015.48.4.275.

- Li, S. H., y Graham, B. M. (2017). Why are women so vulnerable to anxiety, trauma-related and stress-related disorders? The potential role of sex hormones. *The Lancet Psychiatry*, 4(1), 73–82. DOI:10.1016/s2215-0366(16)30358-3.
- LeGates, T. A., Kvarta, M. D., y Thompson, S. M. (2019). Sex differences in antidepressant efficacy. *American College of Neuropsychopharmacology*, 44(1), 140–154. DOI:10.1038/s41386-018-0156-z.
- Lesage, J., Bernet, F., Montel, V., y Dupouy, J. P. (1996). Hypothalamic metabolism of neurotransmitters (serotonin, norepinephrine, dopamine) and NPY, and gonadal and adrenal activities, during the early postnatal period in the rat. *Neurochemical research*, 21(1), 87–96. DOI: 10.1007/BF02527676.
- Liu, J., Hu, P., Qi, X., Meng, F., Kalsbeek, A., y Zhou, J. (2011). Acute restraint stress increases intrahypothalamic oestradiol concentrations in conjunction with increased hypothalamic oestrogen receptor  $\beta$  and aromatase mRNA expression in female rats. *Journal of Neuroendocrinology*, 23(5), 435–443. DOI:10.1111/j.1365-2826.2011.02123.x.
- Lovick, T. A. (2012). Estrous cycle and stress: Influence of progesterone on the female brain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 45(4), 314–320. DOI:10.1590/s0100-879x2012007500044
- Lund, T. D., Munson, D. J., Haldy, M. E., y Handa, R. J. (2004). Androgen inhibits, while oestrogen enhances, restraint-induced activation of neuropeptide neurones in the paraventricular nucleus of the hypothalamus. *Journal of Neuroendocrinology*, 16(3), 272–278. DOI:10.1111/j.0953-8194.2004.01167.x.
- Macho, L., Kvetnanský, R., Culman, J., y Ficková, M. (1986). Neurotransmitter levels in the hypothalamus during postnatal development of rats. *Experimental and clinical endocrinology*, 88(2), 142–150. DOI:10.1055/s-0029-1210589.
- McAllister, C. E., Creech, R. D., Kimball, P. A., Muma, N. A., y Li, Q. (2012). GPR30 is necessary for estradiol-induced desensitization of 5-HT<sub>1A</sub> receptor signaling in the paraventricular nucleus of the rat hypothalamus. *Psychoneuroendocrinology*, 37(8), 1248–1260. DOI: 10.1016/j.psyneuen.2011.12.018.

- McEwen, B. S., Akama, K. T., Spencer-Segal, J. L., Milner, T. A., y Waters, E. M. (2012). Estrogen effects on the brain: Actions beyond the hypothalamus via novel mechanisms. *Behavioral Neuroscience*, 126(1), 4–16. DOI:10.1037/a0026708.
- McQueen, J. K., Wilson, H., y Fink, G. (1997). Estradiol-17 beta increases serotonin transporter (SERT) mRNA levels and the density of SERT-binding sites in female rat brain. *Molecular Brain Research*, 45(1), 13–23. DOI: 10.1016/s0169-328x(96)00233-1.
- Melnick, I., Krishtal, O. A., y Colmers, W. F. (2020). Integration of energy homeostasis and stress by parvocellular neurons in rat hypothalamic paraventricular nucleus. *The Journal of Physiology*. DOI:10.1113/jp279387.
- Mesnick, S., y Ralls, K. (2018). Sexual dimorphism. *Encyclopedia of Marine Mammals*, 848–853. DOI:10.1016/b978-0-12-804327-1.00226-0.
- Mitra, S., Hoskin, E., Yudkovitz, J., Pear, L., Wilkinson, H., Hayashi, S. y Alves, S. E. (2003). Immunolocalization of estrogen receptor  $\beta$  in the mouse brain: Comparison with estrogen receptor  $\alpha$ . *Endocrinology*, 144(5), 2055–2067. DOI:10.1210/en.2002-221069.
- Mullol, J., Pujols, L., y Picado, C. (1996). Mecanismos de acción de los glucocorticoides: Aplicación al tratamiento de la inflamación respiratoria. *Archivos de Bronconeumología*, 32(10), 527–534. DOI:10.1016/s0300-2896(15)30689-x.
- Nautiyal, K.M. y Hen, R. (2017). Serotonin receptors in depression: From A to B. *F1000Research 2017*. DOI:10.12688/f1000research.9736.1.
- Nilaver, G., Zimmerman, E. A., Wilkins, J., Michaels, J., Hoffman, D., y Silverman, A. J. (1980). Magnocellular hypothalamic projections to the lower brain stem and spinal cord of the rat. Immunocytochemical evidence for predominance of the oxytocin-neurophysin system compared to the vasopressin-neurophysin system. *Neuroendocrinology*, 30(3), 150–158. DOI: 10.1159/000122991.

- Osterlund, M. K., y Hurd, Y. L. (1998). Acute 17 beta-estradiol treatment down-regulates serotonin 5HT1A receptor mRNA expression in the limbic system of female rats. *Brain research. Molecular brain research*, 55(1), 169–172. DOI: 10.1016/s0169-328x(98)00018-7.
- Oyola, M., Thompson, M., Handa, A., y Handa, R. (2017). Distribution and chemical composition of estrogen receptor  $\beta$  neurons in the paraventricular nucleus of the female and male mouse hypothalamus. *The Journal of Comparative Neurology*. 2017 Dec 1;525(17):3666-3682. DOI: 10.1002/cne.24295.
- Oyola, M. y Handa R. (2017) Hypothalamic-Pituitary-Adrenal and Hypothalamic-Pituitary-Gonadal axes: Sex differences in regulation of stress responsivity. *Stress*. 2017 Sep;20(5):476-494. DOI: 10.1080/10253890.2017.1369523.
- Pavlidi, P., Kokras, N., y Dalla, C. (2021). Antidepressants' effects on testosterone and estrogens: What do we know?. *European Journal Of Pharmacology*, 899, 173998. DOI: 10.1016/j.ejphar.2021.173998
- Paxinos, G. y Watson, C. (2006) *The Rat Brain in stereotaxic coordinates*. London, United Kingdom: Elsevier Academic Press.
- Qin, C., Li, J., y Tang, K. (2018). The paraventricular nucleus of the hypothalamus: Development, function, and human diseases. *Endocrinology*, 159(9), 3458–3472. DOI:10.1210/en.2018-00453.
- Raap, D. K., DonCarlos, L. L., Garcia, F., Zhang, Y., Muma, N. A., Battaglia, G., y Van de Kar, L. D. (2002). Ovariectomy-induced increases in hypothalamic serotonin-1A receptor function in rats are prevented by estradiol. *Neuroendocrinology*, 76(6), 348–356. DOI: 10.1159/000067582.
- Rodríguez, V. M., Limón-Pacheco, J. H., Mendoza-Trejo, M. S., González-Gallardo, A., Hernández-Plata, I., y Giordano, M. (2013). Repeated exposure to the herbicide atrazine alters locomotor activity and the nigrostriatal dopaminergic system of the albino rat. *NeuroToxicology*, 34, 82–94. DOI: 10.1016/j.neuro.2012.10.012.



- Russell, G., y Lightman, S. (2019). The human stress response. *Nature Reviews Endocrinology*. DOI: 10.1038/s41574-019-0228-0.
- Sawchenko, P. E., y Swanson, L. W. (1982). Immunohistochemical identification of neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus that project to the medulla or to the spinal cord in the rat. *The Journal of comparative neurology*, 205(3), 260–272. DOI: 10.1002/cne.902050306.
- Sher, L., Oquendo, M., Galfalvy, H., Cooper, T. y Mann, J. (2004). The number of previous depressive episodes is positively associated with cortisol response to fenfluramine administration. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1032(1), 283–286. DOI:10.1196/annals.1314.039.
- Sladek, C. D., Michelini, L. C., Stachenfeld, N. S., Stern, J. E., y Urban, J. H. (2015). Endocrine-Autonomic Linkages. *Comprehensive Physiology*, 1281–1323. DOI:10.1002/cphy.c140028.
- Slifirski, G., Król, M. y Turło, J. (2021) 5-HT Receptors and the development of new antidepressants. *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 9015. DOI: 10.3390/ijms22169015.
- Stern, J. y Zhang, W. (2003) Preautonomic neurons in the paraventricular nucleus of the hypothalamus contain estrogen receptor beta. *Brain*. 975(1-2):99-109. DOI: 10.1016/s0006-8993(03)02594-0.
- Sumner, B. E., Grant, K. E., Rosie, R., Hegele-Hartung, C., Fritzscheier, K. H., y Fink, G. (1999). Effects of tamoxifen on serotonin transporter and 5-hydroxytryptamine(2A) receptor binding sites and mRNA levels in the brain of ovariectomized rats with or without acute estradiol replacement. *Molecular Brain Research*, 73(1-2), 119–128. DOI: 10.1016/s0169-328x(99)00243-0.
- Swanson, L. W. (2018) Brain maps 4.0-Structure of the rat brain: An open access atlas with global nervous system nomenclature ontology and flatmaps. *Journal of Comparative Neurology*, 526(6), 935–943. DOI: 10.1002/cne.24381.

- Tao, Y. (2010). The melanocortin-4 receptor: Physiology, Pharmacology, and Pathophysiology. *Endocrine Reviews*, 31(4), 506–543. DOI:10.1210/er.2009-0037.
- Uphouse, L. (1997). Multiple serotonin receptors: Too many, not enough, or just the right number?. *Neuroscience & Biobehavioral Reviews*, 21(5), 679–698. DOI:10.1016/s0149-7634(96)00022-x.
- Vielhaber, K., Riemann, D., Feige, B., Kuehlz, A., Kirschbaum, C. y Voderholzer, U. (2005). Impact of experimentally induced serotonin deficiency by tryptophan depletion on saliva cortisol concentrations. *Pharmacopsychiatry*. 2005 Mar; 38(2):87-94. DOI: 10.1055/s-2005-837808.
- Westwood, R. (2008). The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375–384. DOI:10.1177/0192623308315665.
- Wirth, A., Holst, K., y Ponimaskin, E. (2017). How serotonin receptors regulate morphogenic signalling in neurons. *Progress in Neurobiology*, 151, 35–56. DOI: 10.1016/j.pneurobio.2016.03.007.
- Xu, Y., Nedungadi, T. P., Zhu, L., Sobhani, N., Irani, B. G., Davis, K. E., Zhang, X., Zou, F., Gent, L. M., Hahner, L. D., Khan, S. A., Elias, C. F., Elmquist, J. K., y Clegg, D. J. (2011). Distinct hypothalamic neurons mediate estrogenic effects on energy homeostasis and reproduction. *Cell Metabolism*, 14(4), 453–465. DOI: 10.1016/j.cmet.2011.08.009.

## X. ANEXOS

### X.I. Carta de aprobación de Comité de Bioética



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO  
FACULTAD DE MEDICINA



Facultad de Medicina a 10 de marzo del 2021

**Kenny Alejandra Ruiz García**  
Presente

Por medio de la presente le hacemos llegar las observaciones y recomendaciones al protocolo:

Determinación de la expresión del receptor de serotonina 7 en el núcleo paraventricular del hipotálamo durante el ciclo estral de la rata.

Que ha turnado a este Comité de Bioética:

Cumple con requisitos de sacrificio y manejo de material biológico.

Con base en lo anterior el dictamen Correspondiente es de:

**APROBADO**

**"EDUCO EN LA VERDAD Y EN EL HONOR"**

**"POR LA VIDA Y LA SALUD"**

**Dr. Carlos Francisco Sosa Ferreyra**  
Presidente del Comité de Bioética  
Facultad de Medicina

**MIMEM Claudia Verónica Cabeza Cabrera**  
Secretaria del Comité de Bioética  
Facultad de Medicina



Cc. Archivo

## X.II. Carta Registro del Protocolo de Investigación

**Universidad Autónoma de Querétaro**  
Dirección de Investigación y Posgrado  
Registro del Protocolo de Investigación del Estudiante de Posgrado

Espacio exclusivo para la Dirección

No. Registro de Proyecto\*: 13863  
Fecha de Registro\*: 27/03/2023  
Fecha de inicio de proyecto: 04/enero/2022  
Fecha de termino de proyecto: 31/julio/2023


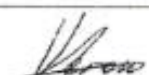

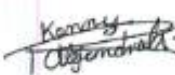
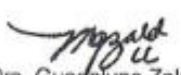
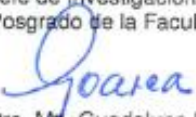
**1. Datos del solicitante:**

No. de expediente: 253655  
Nombre: García Kenny Alejandra  
Apellido Paterno: Apellido Materno Nombre(s)  
  
Dirección:  
Yuca 202-3 Arboledas 76140  
Calle y número Colonia C.P.  
  
Querétaro 521 786 127 37 28  
Estado Querétaro Teléfono (incluir lada)

**2. Datos del proyecto:**

Facultad: Facultad de Medicina  
Especialidad en: \_\_\_\_\_  
Maestría en: Maestría en Ciencias en Neurometabolismo  
Doctorado en: \_\_\_\_\_  
Tema específico del proyecto: Determinación de la expresión del receptor de serotonina 7 en el núcleo paraventricular del hipotálamo en el ciclo estral de la rata



 Dra. Nancy Georgina Hernández Chan Director de Tesis <sup>1</sup>	 Dra. Verónica Mireya Rodríguez Córdoba Co-director <sup>1</sup>	 Dr. Nicolás Camacho Calderón Jefe de Investigación y Posgrado de la Facultad <sup>1</sup>
 Kenny Alejandra Ruiz García Alumno <sup>1</sup>	 Dra. Guadalupe Zaldívar Lelo de Larrea Directora de Facultad <sup>1</sup>	 Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña Directora de Investigación y Posgrado <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Escribir nombre completo y firma.

### X.III. Evidencia fotográfica



#### X.IV. Conteo celular

<b>Sujeto</b>	<b>Células inmunopositivas a 5-HT7r en NPV: Corte Anterior</b>				
<b>Macho</b>	448	495	372	429	308
<b>Proestro</b>	543	299	339	463	
<b>Estro</b>	357	334	142	305	278
<b>Metaestro</b>	334	187	249	272	
<b>Diestro</b>	449	505	331	337	462

**Cuadro 1.** Células inmunopositivas a 5-HT7r en corte anterior de NPV por cada grupo. n= 23.

<b>Sujeto</b>	<b>Células inmunopositivas a 5-HT7r en NPV: Corte Medio</b>				
<b>Macho</b>	317	296	357	286	337
<b>Proestro</b>	273	419	327	357	243
<b>Estro</b>	321	306	191	299	199
<b>Metaestro</b>	133	284	295	293	404
<b>Diestro</b>	270	304	272	426	343

**Cuadro 2.** Células inmunopositivas a 5-HT7r en corte medio de NPV por cada grupo. n= 25.

<b>Sujeto</b>	<b>Células inmunopositivas a 5-HT7r en NPV: Corte Posterior</b>					
<b>Macho</b>	116	207	107	126	118	
<b>Proestro</b>	170	179	127	174	176	
<b>Estro</b>	137	137	118	182	54	
<b>Metaestro</b>	133	138	185	121		
<b>Diestro</b>	107	172	100	144	59	232

**Cuadro 3.** Células inmunopositivas a 5-HT7r en corte posterior de NPV por cada grupo. n= 25.