

03086

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO**

**Colegio de Ciencias y Humanidades  
Unidad Académica de los Ciclos Profesionales y de Posgrado**

**Centro de Neurobiología**

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN LOS MECANISMOS  
NEUROENDÓCRINOS QUE REGULAN LA PUBERTAD EN LA HEMBRA. LA  
RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
DOCTOR EN CIENCIAS FISIOLÓGICAS**

**PRESENTA:**

**MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR**

**México D.F. 1995**

**FALLA DE ORIGEN**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO  
COLEGIO DE CIENCIAS Y HUMANIDADES  
UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONALES Y DE POSGRADO**

**PARTICIPACIÓN DEL SISTEMA SEROTONINÉRGICO EN LOS MECANISMOS  
NEUROENDÓCRINOS QUE REGULAN LA PUBERTAD EN LA HEMBRA. LA  
RATA COMO MODELO EXPERIMENTAL.**

**Autor: MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR**

**Director: Dr. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ**

**La tesis fue desarrollada en a Unidad de Investigación en Biología de la  
Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.**

**Durante el desarrollo de la tesis se contó con el apoyo de DGPA, proyecto  
IN210893; CONACyT, proyecto IN1719; PUIS UNAM; PADEP, proyecto  
DCCH9238, 030368 y 03327.**

## **AGRADECIMIENTOS**

**Al Dr. Roberto Domínguez Casalá por su acertada dirección y ayuda brindada para la elaboración de esta tesis.**

**A los miembros del jurado:**

**Dr. Manuel Salas Alvarado  
Dr. Carlos Valverde Rodríguez  
Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera  
Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán  
Dr. Roberto Domínguez Casalá  
Dr. Enrique Pedernera Astegiano  
Dr. Fernando Antón Tay**

**A Lety y Angélica por su apoyo y amistad que me han brindado en todo momento.**

**Gracias a cada uno de mis compañeros que trabaja en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por su amistad y apoyo brindado.**

**A todos los trabajadores del Bioterio de la FES-Zaragoza, por su valiosa cooperación técnica en el mantenimiento de los animales.**

**A MIS PADRES Y HERMANOS**

**POR SU CONSTANTE APOYO Y ESTÍMULO BRINDADO**

**GRACIAS POR SU APOYO Y AMOR**

Lista tesis se baso en las siguientes publicaciones:

Ayala, M.E., Rosas, P. Y Domínguez, R. (1994). Modifications in follicular population induced by lesion of the dorsal raphe nucleus lesion (DRN). **Biology of Reproduction** **50**: Suppl 1, Abs 42; Ann Arbor, Michigan, USA.

Ayala M.E., Rosas P. y Domínguez, R. (1994). Different effects on unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation. **Brain Res. Bull.**, **34**: 27-30.

Ayala, M.E., Monroy, J. y Domínguez, R. (1995). There is not relationship between serotonin content in the hypothalamus and ovulation, in prepubertal rats with a lesion in the dorsal raphe nucleus (DRN). **Biology of Reproduction** **52**: Suppli 1, Abs 135; Davis, California, USA.

## ÍNDICE

<b>RESUMEN.....</b>	<b>i</b>
<b>SUMMARY.....</b>	<b>iii</b>
<b>INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>1</b>
<b>Organización del sistema serotoninérgico en el sistema nervioso central.....</b>	<b>4</b>
<b>Participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas.....</b>	<b>8</b>
<b>Participación del núcleo dorsal del rafé en la regulación de la secreción de las gonadotropinas.....</b>	<b>11</b>
<b>Pubertad.....</b>	<b>13</b>
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>21</b>
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>22</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>22</b>
<b>METAS.....</b>	<b>23</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
<b>Estudio de la ontogenia del sistema serotoninérgico del hipotálamo a partir del nacimiento al primer estro vaginal.....</b>	<b>28</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>28</b>
<b>Estudio de los efectos de la lesión del núcleo dorsal del rafé en la etapa infantil y juvenil sobre la ovulación espontánea.....</b>	<b>36</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>37</b>
<b>Efecto del reemplazo hormonal en animales con lesión del núcleo dorsal del rafé.....</b>	<b>51</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>52</b>
<b>Estudio temporal de los cambios producidos en el sistema serotoninérgico del hipotálamo de ratas prepúberes, por lesión del núcleo dorsal del rafé.....</b>	<b>55</b>
<b>Resultados.....</b>	<b>56</b>
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>79</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>95</b>

<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>97</b>
<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>98</b>
<b>PUBLICACIONES.....</b>	<b>108</b>

## RESUMEN

La secreción de las gonadotropinas es regulada por diferentes sistemas de neurotransmisión, entre ellos el sistema serotoninérgico. Existen evidencias controversiales que muestran la participación de este sistema en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación. Por ello en el presente estudio se analizaron los cambios en la actividad de los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico del hipotálamo durante el desarrollo prepuberal de la rata hembra. Así mismo, se estudiaron los efectos de la eliminación de la información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del raquídeo, por medio de la lesión de dicho núcleo al final de la fase infantil (día 21) ó en la fase juvenil (día 24, 27 ó 30), sobre la pubertad, el crecimiento y la maduración folicular, la primera ovulación y los cambios en la actividad de los sistemas serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico.

La concentración de serotonina (5-HT), dopamina (DA) y noradrenalina (NA) y la actividad de la neurona serotoninérgica presentó variaciones a lo largo del desarrollo del animal prepúber. Además, la actividad de la neurona serotoninérgica fue alta al final de la fase infantil (día 21) y juvenil (día 39), mientras que una menor actividad en el día 24 y 27 de edad.

La lesión del núcleo dorsal del raquídeo efectuada al final de la fase infantil retrasó la edad de la apertura vaginal y del primer estro en comparación con su grupo con operación simulada ( $39.9 \pm 1.03$  vs.  $45.6 \pm 0.94$ ,  $p < 0.05$ ), en cambio cuando se lesionó el núcleo en la fase juvenil no se modificaron tales parámetros. En el día del primer estro vaginal ninguno de los animales lesionados en el día 30 ovuló ( $12/16$  vs  $0/14$ ,  $p < 0.05$ ) y el número de los folículos preovulatorios cuantificados en los ovarios de estos animales fueron atrésicos ( $5.33 \pm 0.88$  vs  $1.75 \pm 0.32$ ,  $p < 0.05$ ). En cambio, en los animales lesionados en los 21, 24 ó 27 días de edad la proporción de animales que ovularon al estro no se modificó en relación con su respectivo grupo con operación simulada ( $7/9$  vs  $6/12$ ;  $13/14$  vs  $10/12$ ;  $10/10$  vs.  $8/13$ , NS respectivamente). Sin embargo, el número de ovocitos liberados por animal ovulante se incrementó en los animales con lesión del raquídeo en el día 24 ó 27 de edad ( $9.5 \pm 0.4$  vs  $7.4 \pm 0.4$ ;  $9.5 \pm 0.5$  vs  $7.7 \pm 0.4$ ,  $p < 0.05$ , respectivamente) y en los ovarios de estos animales disminuyó el índice de atresia en los folículos preovulatorios.

En el día del primer estro vaginal, la concentración de serotonina en el hipotálamo de todos los animales lesionados disminuyó significativamente (21 días,  $0.12 \pm 0.03$  vs  $0.99 \pm 0.1$ ; 24 días,  $0.19 \pm 0.01$  vs  $0.92 \pm 0.09$ ; 27 días,  $0.14 \pm 0.01$  vs  $0.93 \pm 0.07$ ; 30 días,  $0.12 \pm 0.02$  vs  $0.94 \pm 0.3$ ,  $p < 0.05$  respectivamente) y se incrementó la actividad de la neurona serotoninérgica. La disminución de la concentración de 5-HT en el hipotálamo fue evidente a las 48 horas de la lesión no se observaron modificaciones en las concentraciones de DA y NA.

En los animales con lesión del rafé en el día 30, en los que se observó el bloqueo de la ovulación, el reemplazo hormonal con 10 u.i. de gonadotropina coriónica humana (hCG por sus siglas en inglés) indujo ovulación en el 60 % de los animales y el número de ovocitos liberados fue igual a su grupo con operación simulada ( $7.0 \pm 0.6$  vs  $7.7 \pm 0.4$ , NS).

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten sugerir que, las modificaciones observadas en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé durante la fase juvenil, no se correlacionan con los cambios en la concentración de serotonina en el hipotálamo. Estos resultados posiblemente están vinculados a la actividad de otros sistemas de neurotransmisión como el catecolaminérgico y GABAérgico. Además, los resultados apoyan la idea de que el sistema serotoninérgico del hipotálamo, que se origina del núcleo dorsal del rafé participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación, y que su participación varía durante el desarrollo del animal.

## SUMMARY

Serotonin, among others, is one of the neurotransmitters participating on the regulation of gonadotrophin secretion and ovulation. Because there is contradictory evidence on the role of serotonin in this control, the present study was designed to analyze whether there are changes in neuronal activity of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic systems associated with the prepubertal development of the female rat. The effects of the decrease of serotonergic hypothalamic-input arising from the dorsal raphe nucleus, produced by lesion of the dorsal raphe nucleus performed at end of infantile period (21-day), or different stages of the juvenile (24, 27, or 30-day) on the puberty, follicular development, first ovulation and changes of activity of serotonergic, dopaminergic and noradrenergic systems, were also analyzed.

The concentration of serotonin, dopamine and norepinephrine in the hypothalamus, as well as the activity of serotonergic neuron, showed changes during the prepubertal period, with higher values on days 21 and 30 of age, and lower on days 24 and 27.

In comparison with sham-operated animals, the age of vaginal opening and first vaginal estrous was delayed in rats with a lesion on the dorsal raphe nucleus performed at the end of the infantile period ( $39.9 \pm 1.03$  vs.  $45.6 \pm 0.94$ ,  $p < 0.05$ ), while differences with sham-operated animals on these parameters were not observed in animals with a lesion performed during the juvenile period. On the day of first of vaginal estrous, none of the animals with a lesion performed on 30-day old ovulated (12/16 vs. 0/14,  $p < 0.04$ ) and in the preovulatory follicles, the atresia was increased ( $5.33 \pm 0.88$  vs.  $1.75 \pm 0.32$ ,  $p < 0.05$ ). Differences in ovulation rate in animals with a lesion performed on days 21, 24 or 27, were not observed (7/9 vs. 6/12; 13/14 vs. 10/12; 10/10 vs. 8/13). The number of ova shed by ovulating animal was increased in those rats with a lesion performed on 24 or 27-day old animals ( $9.5 \pm 0.4$  vs.  $7.4 \pm 0.4$ ;  $9.5 \pm 0.5$  vs.  $7.7 \pm 0.4$ ,  $p < 0.05$ ), while the follicular atresia in the ovaries of these animals diminished significantly.

On the day of first vaginal estrous, the serotonin-hypothalamic concentration was reduced in all animals with a lesion in the dorsal raphe nucleus (21-day,  $0.12 \pm 0.03$  vs.  $0.99 \pm 0.1$ ; 24-day,  $0.19 \pm 0.01$  vs.  $0.92 \pm 0.09$ ; 27-day,  $0.14 \pm 0.01$  vs.  $0.93 \pm 0.07$ ; 30-day,  $0.12 \pm 0.02$  vs.  $0.94 \pm 0.03$ ,  $p < 0.05$ ), while the serotonergic-neuronal activity was higher than in sham-operated ones. Differences in the dopamine and norepinephrine concentrations in these animals, were not observed.

The administration of 10 u.i. of human chorionic gonadotrophin (hCG) to animals with a lesion on 30-day old induced ovulation in 60 % of the animals, and

the number of ova shed by ovulating animals was similar to control ones ( $7.0 \pm 0.6$  vs.  $7.7 \pm 0.4$ ).

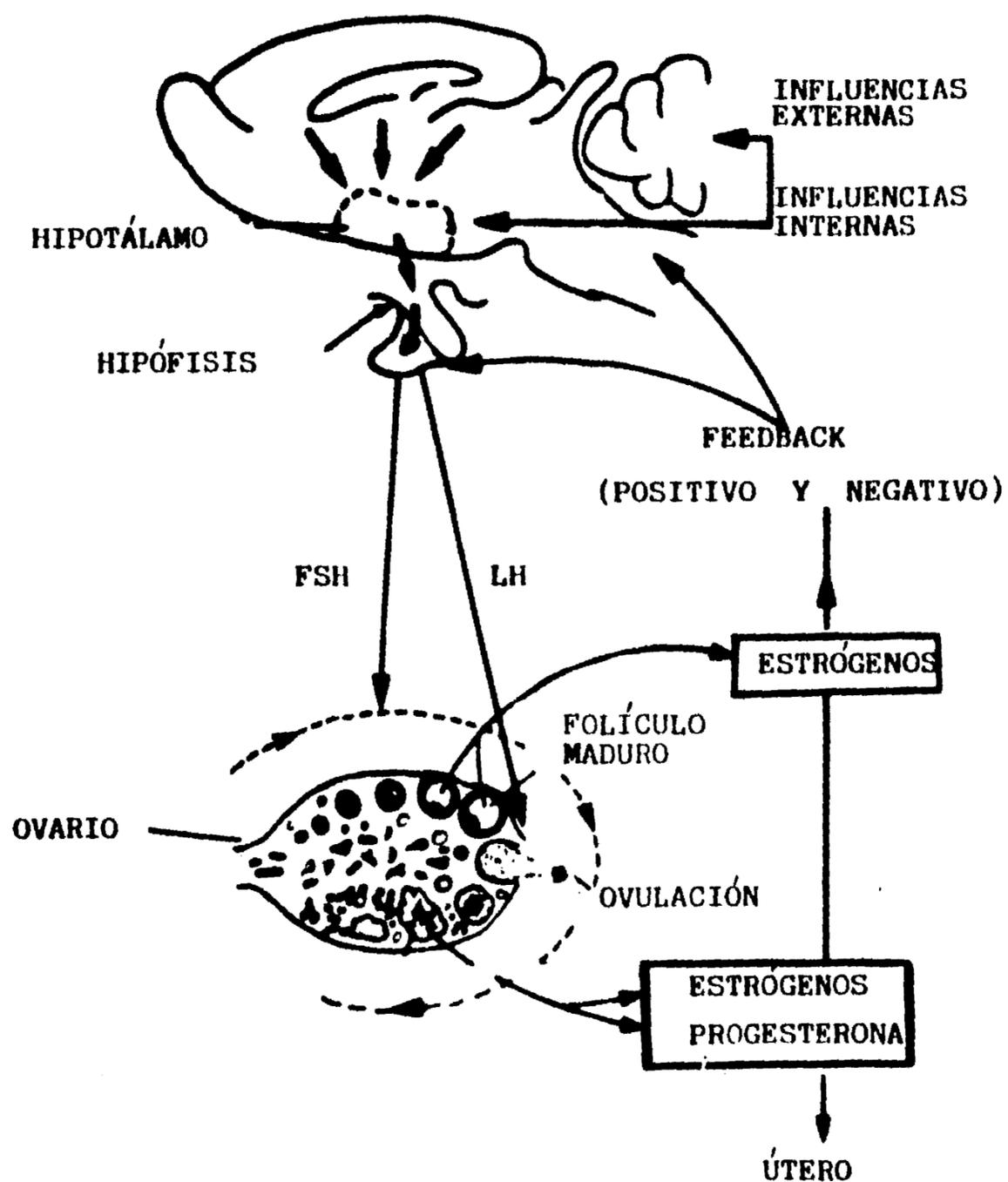
The results obtained in present study suggest that the modifications in spontaneous ovulation, induced by lesion the dorsal raphe nucleus, do not depend on the hypothalamic serotonin content. Such results could be explained by modifications in the catecholaminergic and GABAergic systems. Present results support the idea that the participation of the serotonergic-system, arising from the dorsal raphe nucleus, on the neuroendocrine mechanisms regulating the onset of puberty and the first ovulation, varies with the maturation of the animal.

## INTRODUCCIÓN

La secreción de las hormonas estimulante del folículo (FSH por sus siglas en inglés) y luteinizante (LH por sus siglas en inglés) es regulada por el hipotálamo, centro que sirve de vía final común en la integración de todos los factores externos e internos que participan en este mecanismo. La relación entre el hipotálamo y la hipófisis en la regulación de la síntesis y la secreción de las gonadotropinas se realiza por intermedio de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH por sus siglas en inglés), que es liberada en la eminencia media y llega a la hipófisis vía el sistema de conexión vascular denominado sistema porta hipotálamo-hipofisiario (Fink, 1986, 1988; Freeman, 1994; Silverman et al, 1994) (Fig. 1).

La GnRH es un péptido sintetizado por neuronas especializadas, denominadas GnRHérgicas. Por estudios de inmunocitoquímica se ha mostrado que sus somas se localizan en el órgano vascular de la lamina terminal, en la región preóptica medial, el hipotálamo anterior, los núcleos arcuato y supraquiasmático, la eminencia media y otras estructuras del sistema nervioso central. La distribución de los mismos no es uniforme en los diferentes núcleos hipotalámicos (Freeman, 1994; Silverman et al, 1994).

Según diversos autores, en el hipotálamo existen dos "centros" reguladores de la liberación de las gonadotropinas. El "centro tónico", localizado en los núcleos arcuato y ventromedial, también denominó área hipofisiotrófica, que regula la secreción basal de las gonadotropinas en cantidades suficientes para estimular el desarrollo de los folículos ováricos y la secreción de estrógenos; y el "centro cíclico", en el que participan el área preóptica e hipotalámica anterior y el núcleo supraquiasmático, responsables de la liberación preovulatoria de las gonadotropinas y que culmina con la ovulación (Fink, 1988; Freeman, 1994).



**Fig.1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario en el control del ciclo ovárico por la hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH). La secreción de las gonadotropinas es regulada por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). La modulación de la secreción de la GnRH, por los mecanismos de retroalimentación estimulante e inhibitorio que ejercen los estrógenos ováricos . (Fink, 1988).**

Existen evidencias experimentales que muestran que en la regulación de la secreción de la GnRH participan las hormonas ováricas (estrógenos, progesterona) y varios sistemas de neurotransmisores como el catecolaminérgico, colinérgico y serotoninérgico, cuyos somas neuronales se localizan a nivel intra y extrahipotalámico (Freeman et al, 1994; Hamon et al, 1986; Héry et al, 1976; Kordon et al, 1980, 1994; Weiner et al, 1988). Con base en diversos estudios se ha postulado que la noradrenalina y la acetilcolina estimulan la liberación de la GnRH, la dopamina la inhibe y la serotonina pueden tener efectos inhibidores o estimulantes, dependiendo del modelo experimental, del medio ambiente hormonal en que se encuentre el animal o de ambos (Cramer y Barraclough 1978; Kordon et al, 1994; Meyer y Eadens, 1985; Montagne y Calas, 1988; Vitale et al, 1984).

Entre los neurotransmisores que regulan la secreción de la GnRH, también se encuentran los aminoácidos como: el glutamato, el aspartato, que estimulan la síntesis y liberación de la GnRH (Carbone et al, 1992; Goroll et al, 1994) y el aminoácido gama amino butírico (GABA) y los péptidos opioides que la inhiben (Mena-Valdivia et al, 1995).

Se ha sugerido que las neuronas serotoninérgicas modulan la secreción de las gonadotropinas por sus acciones sobre las neuronas productoras de la GnRH. Por estudios de inmunocitoquímica y autorradiografía se ha mostrado que a la región preóptica medial y la eminencia media llegan axones que hacen sinapsis con las neuronas secretoras de la GnRH y aproximadamente el cinco por ciento de estas fibras son serotoninérgicas (Kiss y Halasz, 1985). Estas evidencias permiten sugerir que en la región preóptica medial, la serotonina puede modular la actividad de la neurona GnRHérgica y como consecuencia la secreción de las gonadotropinas (Soghomonian et al, 1988). Además, en ambas regiones existe una estrecha relación entre las terminales nerviosas serotoninérgicas y las secretoras de noradrenalina y dopamina (Jennes et al, 1982; Soghomonian et al, 1988). Por lo anterior se sugiere que las fibras serotoninérgicas modulan directamente la

síntesis y liberación de la GnRH, o indirectamente por sus efectos en la actividad de las neuronas liberadoras de la noradrenalina y dopamina (Jennes et al, 1982; Kiss y Halasz, 1985; Montagne y Calas, 1988; Soghomonian et al, 1988).

Los estrógenos que son producidos por el complemento anátomo-funcional formado por la teca interna y las células foliculares de los folículos en crecimiento, y la progesterona, secretada principalmente por el cuerpo lúteo, actúan sobre el hipotálamo y la adenohipófisis donde regulan sus respuestas a las acciones de otras hormonas y neurotransmisores (Fink, 1988; Freeman, 1994; Domínguez et al, 1991). Se ha mostrado que las neuronas productoras de la GnRH no tienen receptores a estrógenos (Shivers et al, 1983), lo que permite pensar que los estrógenos estimulan la secreción preovulatoria de la GnRH y de las gonadotropinas por intermedio de otro tipo de neurona que hace sinapsis con esta neurona Silverman et al, 1994). Al parecer los estrógenos y la progesterona regulan la secreción de la GnRH al modular los diferentes sistemas de neurotransmisión (Freeman, 1994; Montagne y Calas, 1988).

Las hormonas esteroideas modulan la tasa de recambio de la serotonina, dopamina y noradrenalina, así como la expresión de sus receptores en el hipotálamo. Además, los receptores a las monoaminas son proteínas, por lo que es posible pensar que las hormonas ováricas están involucradas en regular su síntesis y degradación (Beigon et al, 1980; Montemayor et al, 1990).

### ***Organización del sistema serotoninérgico en el sistema nervioso central***

La inervación monoaminérgica del SNC ha sido estudiada mediante técnicas de histofluorescencia, inmunocitoquímica y autoradiografía, lo que ha permitido identificar en el hipotálamo fibras noradrenérgicas, dopaminérgicas y serotoninérgicas (Crowley y Enland 1981; Kordon et al, 1980; Takeuchi, 1988).

Los cuerpos neuronales de las terminales nerviosas que contienen serotonina se localizan en el núcleo del rafé, el que está formado por un grupo de 6 a 9 paquetes celulares localizados en la parte anterior del mesencéfalo (Crowley y Enland, 1981; Frazer y Hensler 1993; Frankfurt et al, 1981; Soghomonian et al, 1988; Takeuchi 1988). Con base en la distribución de estas células, al núcleo del rafé se le divide en: dorsal, medial y del puente. El núcleo dorsal corresponde a los paquetes de somas neuronales B7 y B6 situados en la porción ventral de la sustancia gris periacueductual; el núcleo medial del rafé, conformado por el paquete B8 y parte del B9, se localiza entre el núcleo central superior y lineal del mesencéfalo; el núcleo del puente que comprende del paquete B1 al B5 está situado más caudalmente (Frazer y Hensler, 1993; Takeuchi, 1988 )(Fig. 2).

Las fibras serotoninérgicas ascienden desde los núcleos dorsal y medial hasta el hipotálamo, la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, áreas rostrales del sistema límbico, al órgano vasculoso de la lámina terminal y la eminencia media. Esta inervación viaja dentro o en posición ventral al haz medial del cerebro anterior (Frazer y Hensler, 1993; Kiss y Halasz, 1985; Soghomonian et al, 1988; Takeuchi, 1988). En el hipotálamo las fibras serotoninérgicas están distribuidas en diversas regiones, como son los núcleos supraquiasmático, que recibe un gran aporte de fibras serotoninérgicas que al parecer se originan principalmente del núcleo medial; el área preóptica, los núcleos paraventricular y arcuato y dorsomedial cuya inervación es moderada y se origina en los núcleos dorsal y medial. El sistema serotoninérgico del puente envía sus fibras hacia el bulbo y la médula donde forma tractos descendentes que terminan a diferentes niveles (Soghomonian et al, 1988; Takeuchi, 1988).

También se ha sugerido que parte de la serotonina hipotalámica proviene de neuronas cuyos somas se localizan en el núcleo dorsomedial del hipotálamo (Montagne y Calas, 1988). Debido a que en este núcleo, es alta la densidad de las terminales serotoninérgicas se pensó que la serotonina tritiada presente en ese

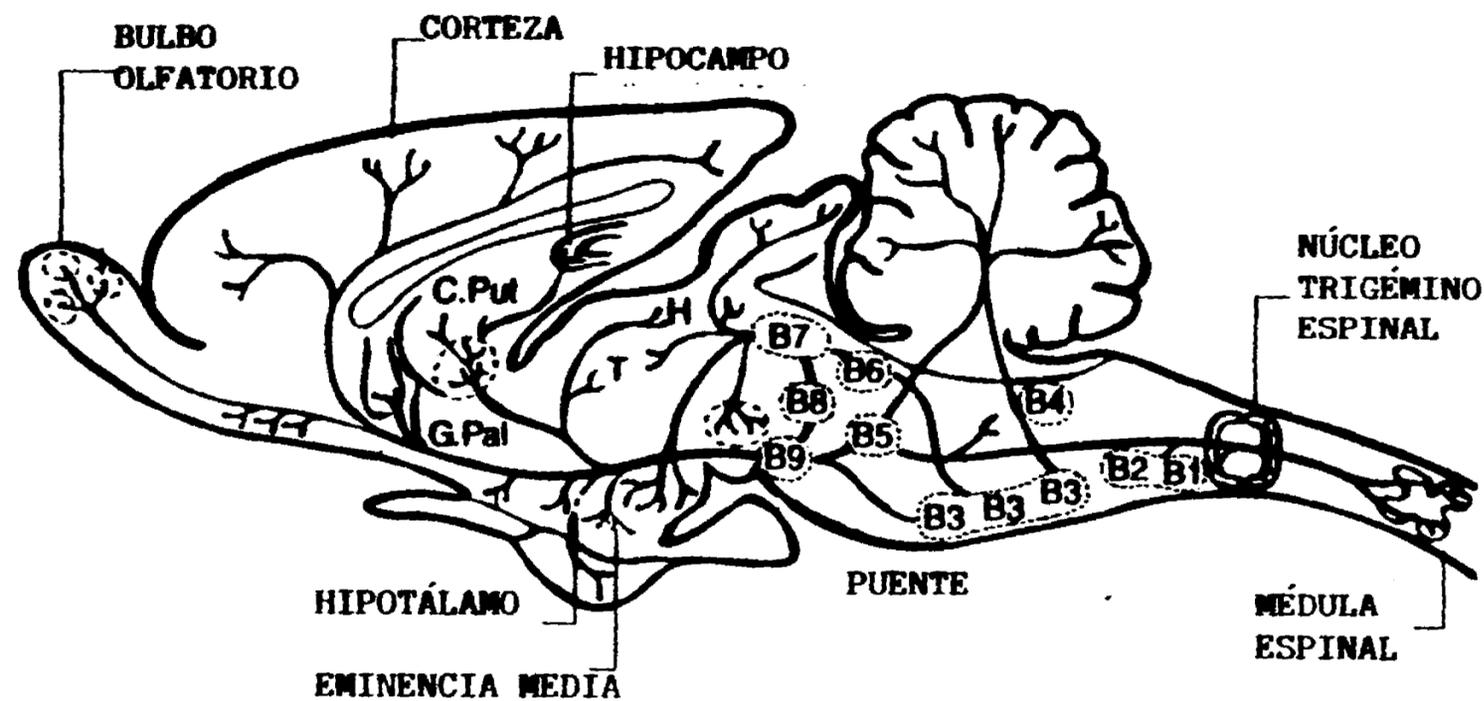


Fig. 2. Localización de los paquetes celulares productores de la serotonina. Corte sagital del cerebro de la rata en el que se muestra la localización de los somas de las neuronas productores de serotonina (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8, B9) y la inervación de las diferentes estructuras del sistema nervioso central. C.Put, núcleo caudado-putamen; G.Pal, globus pallidus; T, tálamo y H. Habénula ( Frazer y Hensler, 1993).

lugar se debía a la recapturada en la (3H)-5HT en la terminal y no a la sintetizada en el soma serotoninérgico. Sin embargo, el hecho de que cuando se realiza la deaferentación del hipotálamo, la serotonina no disminuya por completo en él, dio lugar a apoyar la idea de la presencia de somas neuronales productores de la amina en el propio hipotálamo (Montagne y Calas, 1988).

La concentración de serotonina en la eminencia media disminuye en animales con lesión electrolítica del núcleo dorsal del rafé, en los que también se observa la degeneración de las fibras serotoninérgicas que llegan a la misma. La interpretación de estos resultados es que parte de las terminales serotoninérgicas que se encuentran en la estructura se originan en el núcleo dorsal del rafé (Palkovits et al, 1977). Según algunos autores, en la eminencia media existe una estrecha relación espacial entre las fibras nerviosas serotoninérgicas y las productoras de la GnRH (Jennes et al, 1982; Vitale et al, 1984).

Por estudios de autoradiografía se han caracterizado cuatro tipos de receptores a la serotonina, que se encuentran ampliamente distribuidos en el hipotálamo y otras estructuras del SNC, los cuales están relacionados con diferentes funciones. Cada receptor tiene diferentes subtipos que se designan con una letra. En el hipotálamo se localizan los receptores 5-HT1a, 5-HT1b, 5-HT1c, 5-HT1d y 5-HT2. En cambio, el receptor 5-HT3 se ha identificado únicamente en neuronas periféricas (ganglio cervical superior y nervio vago), así como en el cordón espinal (Frazer y Hensler, 1993; Morilac y Ciaranello, 1993; Prazantelli, 1992).

En el sistema nervioso central la síntesis de la serotonina es regulada por diversos mecanismos. El precursor de su síntesis es el triptofano, el que es transportado a través de la barrera hematoencefálica por un proceso mediado por el acarreador membranal de aminoácidos neutros, por el que compiten otros aminoácidos (Frazer y Hensler, 1993). Es posible que esta competencia sea de

gran importancia fisiológica en la regulación de las concentraciones de triptofano cerebral y para la síntesis de serotonina (Frazer y Hensler, 1993; Schaechter y Wurtman, 1990). Los cambios en la actividad del acarreador se manifiestan en un aumento o una disminución, según sea el caso, del triptofano intracelular disponible para la acción de la enzima triptofano hidroxilasa, lo que se traducirá en el aumento o la disminución de la síntesis de serotonina.

Dos son los factores que intervienen directamente en la regulación de la síntesis de la serotonina; uno las concentraciones de triptofano intracelular y el otro la actividad intrínseca de la enzima triptofano hidroxilasa que transforma el triptofano en 5-hidroxitriptofano (Bourgoin et al, 1977; Schmidt y Sanders-Bush, 1971; Schaechter y Wurtman, 1990).

Diversos estudios del desarrollo ontogénico de este sistema de neurotransmisión han mostrado que las neuronas serotoninérgicas se encuentran entre las primeras células que maduran en el sistema nervioso central y que la inervación serotoninérgica de todas las estructuras que lo conforman, culmina en la tercera semana del desarrollo prepúberal (Lidov y Molliver, 1982a, b; Wallace et al, 1982).

### ***Participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas.***

En la rata existe poca información sobre las vías serotoninérgicas que llegan al hipotálamo y que están vinculadas con la regulación de la secreción de las gonadotropinas y el inicio de la pubertad. Se describe que el sistema serotoninérgico estimula (Brown, 1971; Ruzsas et al, 1982; Vitale et al, 1987; Vitale y Chiocchio, 1993) o inhibe (O'steen, 1964, 1965; Parisi et al, 1983; Vitale y Chiocchio, 1993) la secreción de gonadotropinas, en particular la LH. Estos hallazgos contradictorios pueden ser explicados con base en las diferencias

temporales, hormonales y los modelos experimentales empleados en los diversos estudios.

En el animal prepúber, durante la fase juvenil el tratamiento sistémico con serotonina, inhibe la superovulación inducida por la administración de la gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG por sus siglas en inglés). Este resultado permite sugerir que la serotonina inhibe la secreción de las gonadotropinas y en particular la LH (O'steen, 1964, 1965). En cambio, Brown (1971) observó que el bloqueo farmacológico de la síntesis de serotonina inducido por la administración del metiléster de p-clorofenilalanina inhibe la liberación endógena de la FSH, lo que le lleva a pensar que la serotonina ejerce un efecto estimulador sobre la secreción de esta gonadotropina.

En la rata hembra tratada con serotonina en el día doce de vida, se observó aumento en la concentración de FSH, mientras que cuando el mismo tratamiento se realiza en el día del nacimiento o veinte no se observaron cambios, resultados similares a los observados en los machos de las mismas edades (Becú-Villalobos et al, 1989, 1990).

La administración de serotonina ó 5-hidroxitriptofano (precursor inmediato de la síntesis de serotonina) a ratas de dieciséis o veinte días de edad, resultó en la estimulación de la secreción de LH. Cuando el mismo tratamiento se realizó en los días 21-26 no se observaron efectos sobre las concentraciones plasmáticas de LH, mientras que cuando la estimulación del sistema serotoninérgico se realizó a los 30 días de edad, la concentración de la hormona disminuyó significativamente y no se modificó la de la FSH (Arias, et al, 1990; Bécu-Villalobos y Libertun, 1986; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Justo et al, 1989; Moguilevsky et al, 1985, 1990). En cambio, cuando los mismos tratamientos se realizaron en ratas macho se observó un incremento en la secreción de la FSH sin que se modificara la de la LH. Cuando estos experimentos se realizan en ratas macho castradas a las

48 h de vida, la respuesta al incremento en las concentraciones de serotonina es similar a la observada en las hembras (Justo et al, 1989; Moguevsky et al, 1987, 1990). Estos resultados indican que la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas es diferente durante el desarrollo del animal prepúber y dependen del sexo del animal.

Las respuestas observadas en los diferentes estudios en la participación del sistema serotoninérgico sobre la modulación de la secreción de las gonadotropinas, posiblemente están relacionadas al medio ambiente esteroide en que se encuentra el animal. Además, las diferencias que se presentan entre la hembra y el macho pueden estar vinculadas a las acciones que las hormonas testiculares ejercen sobre los centros nerviosos hipotalámicos, durante su proceso de maduración y cuya diferenciación se realiza durante la etapa postnatal inmediata (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1989; Moguevsky et al, 1987).

La desnervación farmacológica inducida por la administración de la p-cloroanfetamina, inhibidor de la síntesis de serotonina, en animales de 15 y 30 días de edad resultó en el adelanto de la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal e incrementó del número de ovocitos liberados por animal ovulante, mientras que en otras edades los resultados observados son inversos, es decir retraso de la edad de apertura vaginal y del primer estro, o no se modifica ninguno de los parámetros antes mencionados (Ayala et al, 1993). Estos resultados nos permiten sugerir que la serotonina participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas y en la reactividad del ovario a las mismas, donde sus efectos serán estimulatorios o inhibitorios dependiendo del desarrollo prepuberal del animal donde se realicen las manipulaciones.

## ***Participación del núcleo dorsal del raqué en la regulación de la secreción de las gonadotropinas.***

### **1. Animal adulto**

Los resultados obtenidos en diferentes modelos experimentales, señalan que los sistemas serotoninérgicos que se originan en el núcleo dorsal y medial del raqué participan de manera diferencial en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, especialmente la ovulación, tanto en el animal adulto como en el prepúber. Según algunos autores, el núcleo dorsal del raqué estimula la secreción de las gonadotropinas (Héry et al, 1978; Meyer, 1978; Morello y Teleisnik, 1985, 1988; Vitale et al, 1987), mientras que otros sostienen que la inhibe (Arendash y Gallo, 1979).

En la rata y el ratón macho, la administración intraventricular de serotonina disminuye o inhibe la secreción de la FSH y la LH, efecto que depende de la dosis administrada (Van de Kar et al, 1985). En ratas machos con lesión del núcleo dorsal del raqué y la región ventromedial, por inyección del neurotóxico 5,7-dihidroxitriptamina, la concentración de LH en el plasma disminuye significativamente. Este efecto no es modificado por la castración. Lesiones similares en el núcleo medial del raqué, área preóptica o hipotálamo anterior no modifican la secreción de la LH (Van de Kar et al, 1980). Estos resultados permiten suponer que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del raqué, que inerva al hipotálamo medio basal, ejerce una influencia estimuladora en la secreción de la LH.

En la rata hembra adulta castrada, la estimulación electroquímica del núcleo dorsal del raqué inhibe la secreción de la LH durante todo el tiempo en que se mantiene la estimulación. Con base en este experimento, se puede suponer que la información serotoninérgica proveniente del núcleo dorsal del raqué inhibe la

síntesis y liberación de la LH (Arendash y Gallo, 1979). En la rata macho castrada con implante de estradiol, la secreción de LH disminuye cuando se seccionan las fibras serotoninérgicas que se originan en el núcleo dorsal del rafé, mientras que no se modifican cuando se elimina la información proveniente del núcleo medial (Héry et al, 1978). En cambio, la lesión electrolítica del núcleo medial del rafé no modifica la liberación de LH inducida por la progesterona en la rata hembra ovariectomizada (Barofsky, 1975, 1979). Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que la serotonina ejerce un efecto estimulador sobre los mecanismos que inducen la liberación fásica de la LH. Además que, la integridad del núcleo dorsal del rafé es importante para que se produzca este evento, en tanto, que el núcleo medial no parece ejercer una función importante.

Sin embargo, la idea de que el núcleo del rafé medial no participa en los eventos que regulan la secreción de las gonadotropinas es contradictoria a lo que otros autores han encontrado. En la rata hembra cíclica la estimulación eléctrica del núcleo medial del rafé realizada en la tarde del proestro, bloquea la ovulación y disminuye la concentración de LH en plasma, mientras que cuando se lesiona el núcleo medial del rafé, se observan los mismos efectos. Estos resultados apoyan la idea de que la información que se origina en este núcleo ejerce una influencia inhibitoria en la secreción preovulatoria de la LH, en tanto que la que se origina en el núcleo dorsal estimula la secreción de la LH (Morello y Taleisnik, 1985; Morello et al, 1989).

## 2. Animal prepúber

En ratas prepúberes la lesión de los núcleos dorsal y medial del rafé provocada por la administración de la 5,7- dihidroxitriptamina, bloquea la ovulación inducida por la PMSG y disminuye la recaptura de la serotonina en la eminencia media y el núcleo arcuato (Meyer, 1978). Con base en estos resultados, los autores sugieren que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del

rafé, y posiblemente el medial, modulan de manera estimuladora la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

La existencia de los resultados contradictorios sobre la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas puede ser el reflejo de las diferencias temporales y hormonales de los diversos modelos biológicos y condiciones experimentales en las que se realizaron los estudios. También se ha postulado que existen diferentes sistemas serotoninérgicos separados anatómicamente y funcionalmente. Se ha sugerido que las neuronas serotoninérgicas que terminan en la eminencia media ejercen un control inhibitorio sobre la secreción de las gonadotropinas (centro inhibitorio), mientras que en el área preóptica se localiza el centro estimulador o pasivo (Johnson y Crowley, 1986; Kordon et al, 1994).

### **Pubertad**

La capacidad de un animal para reproducirse es el resultado de la coordinación de los componentes neuroendócrinos del sistema reproductor (Adams y Steiner, 1988; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Goldman, 1981; Ojeda et al, 1983; 1993; Ramírez 1973).

Se define a la **pubertad** como la fase biológica del individuo en la que ocurren los eventos neuroendócrinos y fenotípicos que enlazan la inmadurez con la madurez sexual. Esta fase es regulada por diversos mecanismos neuroendócrinos en los que participan las gónadas, el hipotálamo, la hipófisis, las adrenales, el timo y la tiroides entre otros (Adams y Steiner, 1988; Ojeda 1994, Ramírez, 1973).

En la hembra de los roedores, **se define** la pubertad como el día en el que se produce la canalización espontánea de la vagina. Este evento y la aparición del

primer estro vaginal son el resultado del estímulo provocado por los estrógenos secretados por el ovario (Ojeda et al, 1986; 1990; Steinetz, 1973). Según Ramírez (1973), la apertura vaginal en la rata ocurre entre los 35 y 45 días después del nacimiento. El frotis vaginal en ese momento tiene las características de proestro o estro y la ovulación ocurre dentro de las 24 o 48 h posteriores a la canalización vaginal.

Los mecanismos involucrados en la regulación del desarrollo de la pubertad comprenden una serie compleja de eventos interrelacionados que se manifiestan en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada durante el desarrollo del animal prepúber. Las funciones del ovario (secreción de hormonas y ovulación están reguladas por señales neuroendócrinas que se originan en el hipotálamo (secreción de la GnRH), la hipófisis (secreción de las hormonas FSH, LH y prolactina) y del propio ovario (secreción de estrógenos, progesterona, inhibina, otros polipéptidos y neurotransmisores (Adams, 1988; Goldman, 1981; Ojeda y Urbanski, 1986, 1988, 1994; Ramírez, 1973).

### **Fases de la etapa prepuberal en la rata hembra**

La rata es uno de los modelos biológicos más utilizados en el estudio de la regulación del inicio de la pubertad. Con base en parámetros morfológicos y fisiológicos, Ojeda et al, (1988) dividen el lapso comprendido entre el nacimiento y la pubertad, en cuatro etapas: neonatal, infantil, juvenil y peripuberal.

**Etapa neonatal.** Abarca desde el nacimiento hasta el día siete de vida. Esta etapa se caracteriza por la falta de "madurez" del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que se traduce por la baja concentración plasmática de las gonadotropinas y porque los ovarios son muy poco sensibles o insensibles a las gonadotropinas exógenas. Los receptores a la FSH aparecen en las células de la granulosa después del día

cuatro de vida y los receptores a LH después del día diez (Adams y Steiner, 1988; Ojeda y Urbanski, 1988, 1994).

Durante los primeros cuatro o cinco días de vida el ovario es relativamente insensible a las gonadotropinas. Al parecer esta falta de respuesta se debe al bajo contenido de receptores a las gonadotropinas, sin embargo, ya existen folículos en desarrollo. Las células de la granulosa del folículo ovárico presentan receptores a la FSH a partir del día cuatro y su número aumenta hasta el día dieciséis (Ojeda et al, 1983, 1990).

**Infantil.** Se extiende desde el día ocho al veintiuno de vida. En esta fase suceden una serie de cambios en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada que representan los primeros eventos neuroendócrinos que culminan con la pubertad. Durante esta etapa no funciona el *feedback* estimulante o inhibitorio de los estrógenos sobre la secreción de LH, tal y como sucede en el animal adulto (Ojeda y Urbanski, 1994).

En la fase infantil los patrones de secreción de la FSH y LH son diferentes. La concentración sérica de la FSH se incrementa hasta alcanzar valores máximos alrededor de los días diez y quince de vida, desciende en el día veinte, y permanece baja hasta poco antes de la primera liberación preovulatoria de la hormona (proestro temprano). Mientras que, la concentración de la FSH se eleva de manera tónica, la liberación de la LH es en forma desorganizada (Ojeda et al, 1988; Ojeda y Urbanski, 1994).

Por estudios de inmunocitoquímica se observó que el desarrollo de la neurona GnRHérgica del área hipotalámica anterior e hipotálamo medio basal, culmina durante el desarrollo prepuberal de la rata. En la fase neonatal e infantil el soma de las neuronas es regular, mientras que entre la 4a y 5a semana de vida el desarrollo dendrítico de la neurona es completo (Araki et al, 1975; Wray y Hoffman, 1985). Al parecer los estrógenos son uno de los factores que participan en la

regulación del proceso de desarrollo dendrítico de la neurona GnRHérgica (Glass et al, 1986).

La implicación funcional de este proceso de diferenciación de la neurona GnRHérgica no se conoce con exactitud. Sin embargo, es posible que esté involucrado también en el incremento en el número de conexiones sinápticas (Jennes et al, 1985; Wray y Hoffman, 1985). Esta idea es apoyada por que en algunos núcleos del hipotálamo, como el arcuato y en otras estructuras del SNC del animal en desarrollo, el número de formaciones sinápticas aumenta durante el desarrollo del animal (Aghajanian y Bloom et al, 1967; Silverman et al, 1994).

Estos hechos posiblemente sean una explicación a lo observado por Ojeda et al, (1994), quienes señalan que durante la fase infantil la secreción de la GnRH es de forma desorganizada, pero suficiente para inducir el pico de FSH y los picos esporádicos de LH durante la fase infantil. Por lo que la falta de maduración (morfológica y funcional) del sistema productor de la GnRH se refleja en el patrón de secreción de las gonadotropinas que se presenta durante esta fase.

Otro factor que posiblemente puede contribuir a la regulación del patrón de secreción de las gonadotropinas en la fase infantil, es la mayor reactividad de la hipófisis a la GnRH. Este incremento en la reactividad de la glándula parece estar vinculado al aumento en el número de los receptores a la GnRH. Se ha mostrado que el número de sitios de unión y la afinidad de los mismos aumentan a partir del día cinco, alcanzan su máximo alrededor del día veinte y disminuyen a partir del día 40 (Dalkin et al, 1981; Ojeda y Urbanski, 1988).

Durante la fase neonatal, el mecanismo de retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos sobre el eje hipotálamo-hipófisis no es funcional (Ojeda et al, 1983, 1990; Raum y Swerdloff, 1986). Estudios bioquímicos y autoradiográficos han mostrado que en esta fase del desarrollo en el SNC y la hipófisis existen

receptores a los estrógenos (Andrews y Ojeda, 1977) La falta de unión de los estrógenos puede ser explicada por la existencia de altas concentraciones de la  $\alpha$ -fetoproteína en el plasma, molécula que se caracteriza por su gran afinidad por los estrógenos, lo que resultaría en la falta de estrógenos libres que puedan unirse a sus receptores (Frawley y Henrick, 1979). Por lo que las altas concentraciones FSH en plasma durante la fase infantil serían debidas a la inefectividad de los mecanismos de retroalimentación inhibitoria de los estrógenos (Andrews y Ojeda, 1977; Frawley y Henrick, 1979; Ojeda y Urbanski, 1994).

Al final de la fase infantil (día dieciséis) la concentración de la  $\alpha$ -fetoproteína empieza a disminuir y como consecuencia aumenta la concentración de estrógenos libres en el plasma (Frawley y Henrick, 1979). Este evento permitiría que los estrógenos ejerzan su efecto de retroalimentación inhibitoria sobre el SNC y la hipófisis, lo que explicaría la disminución de la concentración de la FSH en plasma después del día dieciséis (Ojeda y Urbanski, 1988; 1994).

La alta concentración de la FSH durante la fase infantil parece ser necesaria para el desarrollo folicular normal y la formación de sus propios receptores. Tal interpretación es apoyada por las evidencias que señalan que la administración de propionato de dihidrotestosterona durante la etapa infantil inhibe la secreción de la FSH y la aparición de sus receptores, lo que provoca que cuando el animal alcanza la etapa juvenil no existen folículos en desarrollo (Meijs-Roelofs et al, 1990). Además, los estrógenos producidos por el folículo en desarrollo estimulan la proliferación de las células de la granulosa y modifican la respuesta de éstas a la FSH. A su vez la FSH estimula la formación de sus propios receptores y junto con los estrógenos inducen la formación de los de la LH (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Shyamal, 1994).

**Juvenil.** Inicia en el día 22 y culmina alrededor de los días 30-32, dependiendo de la cepa de animales en estudio y de las condiciones ambientales en las que se les

mantiene. Durante esta etapa se completan las conexiones funcionales definitivas entre el hipotálamo, la hipófisis y el ovario. Se caracteriza por la desaparición de la secreción desorganizada de la LH, y la disminución de la secreción de la FSH. Durante esta fase el animal responde al estímulo estrogénico con secreción de LH y ovulación (Ojeda et al, 1983).

Durante la fase juvenil el ovario crece y presenta ondas de crecimiento folicular y atresia bajo la influencia de bajas concentraciones de LH y FSH. Además de las hormonas mencionadas, se ha mostrado que otras dos hormonas hipofisiarias participan en la regulación de la maduración del ovario: la somatotropina u hormona de crecimiento (GH) (por sus siglas en inglés) y la prolactina. La concentración plasmática de ambas es baja durante la fase infantil y se incrementa gradualmente (Adams, 1988; Goldman, 1981; Ojeda et al, 1990).

**4).-Peripuberal.** Al igual que la fase juvenil, su duración es variable y culmina con la apertura vaginal y la primera ovulación. Se caracteriza por que se presentan las primeras manifestaciones del aumento de la actividad estrogénica en el útero y en la vagina. Así mismo se establecen las diferencias en la secreción matutina y vespertina de la LH (Ojeda et al, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994 ).

A medida que se llega a la pubertad, aumenta el número de receptores ováricos a la FSH hasta alcanzar su máximo. Al mismo tiempo se incrementa el número de los receptores a la LH, efecto que es dependiente de la misma FSH, de los estrógenos, la prolactina y la hormona de crecimiento. Estudios *in vitro* muestran que la prolactina y la hormona de crecimiento favorecen el desarrollo folicular ya que estimulan la formación de receptores a la LH en las células de la granulosa (Ojeda y Urbanski, 1994). En respuesta a este evento, aumenta la secreción de los estrógenos, por lo que se sugiere que tanto la prolactina como la hormona de crecimiento actúan de manera sinérgica en los efectos estimulatorios de la LH sobre el ovario (Ojeda et al, 1990). Aunado al aumento en el número de

receptores a la LH en la gónada, disminuyen los receptores a la GnRH en las células de la granulosa, lo cual resulta en un aumento en la actividad esteroideogénica (Dalkin et al, 1981).

Conforme el animal madura, los sistemas neuromoduladores estimulantes (sistema catecolaminérgico, serotoninérgico y aminoácidos) actúan en el hipotálamo y sus efectos muestran que la activación sincronizada de la secreción de las neuronas GnRHérgica. Además, estos sistemas son activados durante los días que preceden el primer proestro (Ojeda et al, 1994). A nivel hipotalámico, el aumento en la liberación pulsátil de la GnRH resulta en el incremento en la concentración de la noradrenalina en el área preóptica medial, lo que resulta en la liberación de las gonadotropinas, las que a su vez estimulan el crecimiento de los folículos en el ovario y la secreción de estrógenos (Advis et al, 1978; Wuttke et al, 1980).

Se ha mostrado que en los días previos a la apertura vaginal (proestro temprano) la tasa de recambio de la serotonina y la noradrenalina aumentan, mientras que disminuye la de la dopamina. Al parecer estos cambios en la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión estimulan la secreción de la GnRH, de la LH y como consecuencia la primera ovulación (Advis et al, 1978).

Como consecuencia de lo factores antes mencionados, la concentración plasmática de estrógenos secretados por el ovario aumenta bruscamente para luego disminuir rápidamente ("pico de estrógenos"), lo que desencadena la liberación fásica de GnRH. La secreción preovulatoria de la GnRH, que alcanza una magnitud similar a la que se presenta en la tarde del proestro en el animal adulto, estimula la secreción fásica de las gonadotropinas. El incremento en las concentraciones plasmáticas de éstas se acompaña del crecimiento y la maduración folicular que culmina con la ovulación (Goldman, 1981; Ojeda et al, 1983).

## Teoría del gonadostato

La teoría del gonadostato explica el inicio de la pubertad y propone que conforme el animal madura, disminuye la sensibilidad del eje hipotálamo-hipófisis a los esteroides gonadales. En el animal prepúber, los esteroides gonadales ejercen un efecto inhibitorio sobre la síntesis de las gonadotropinas, por lo que el SNC y la hipófisis son más sensibles a los efectos inhibitorios de los esteroides gonadales que en el animal adulto, lo que explica que en la fase puberal las concentraciones plasmáticas de la FSH y la LH sean bajas. A medida que el animal madura la sensibilidad disminuye y como consecuencia aumenta la síntesis y la liberación de las gonadotropinas, lo que culmina con la ovulación (Advis et al, 1979; Goldman, 1981; Raum et al, 1980). Los cambios en la sensibilidad del hipotálamo a los estrógenos son mediados por los diferentes sistemas de neurotransmisión, entre ellos el sistema serotoninérgico (Raum y Swerdloff, 1986).

Al parecer, el conjunto de eventos neuroendócrinos que caracterizan el desarrollo del animal prepúber y que culmina con la pubertad y la primera ovulación, está vinculado a la acción de los diferentes sistemas de neurotransmisión y entre ellos el sistema serotoninérgico. Sin embargo, hasta el momento las evidencias experimentales existentes sobre la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe son contradictorias. Por ello, para continuar con el análisis de la participación de este sistema de neurotransmisión en la regulación de la pubertad, se decidió utilizar como modelo de experimentación a la rata en las fases infantil y juvenil, según la clasificación propuesta por Ojeda et al, (1988, 1994), en las cuales se realizó la eliminación de la información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe y se evaluaron los efectos producidos en la edad de la apertura vaginal, primer estro vaginal, primera ovulación, crecimiento y maduración folicular y se analizó su posible correlación con los cambios en la actividad del sistema serotoninérgico.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Con base en los antecedentes presentados, se puede considerar que el sistema serotoninérgico modula los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación. Según la información disponible, los estudios realizados sobre la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé sobre la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, se han realizado sin tomar en cuenta la edad o el "ambiente hormonal" en que se encuentra el animal en el cual se realizan las manipulaciones de este núcleo.

En el presente proyecto se estudió la participación del sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo dorsal del rafé sobre los mecanismos que regulan la pubertad y la primera ovulación, por medio del análisis de los efectos de la desnervación serotoninérgica del hipotálamo producida por la lesión del núcleo dorsal del rafé realizada en la etapa infantil o juvenil de la rata, sobre las edades de la apertura y el primer estro vaginal, la ovulación espontánea, las concentraciones de la serotonina, las catecolaminas y sus metabolitos principales en el hipotálamo, así como las variaciones en el tamaño y distribución folicular en el ovario.

## **HIPÓTESIS**

En los mecanismos neuroendócrinos que modulan la pubertad y la primera ovulación, la participación de la información serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del raquí y que llega al hipotálamo, es diferente en las etapas infantil y juvenil. Por ello la lesión de este núcleo provocará efectos estimulantes o inhibitorios sobre la secreción de las gonadotropinas que resultarán en cambios en la primera ovulación, los que dependerán de la etapa en que se encuentra el animal en el momento en que se realicen las manipulaciones.

## **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la participación del sistema serotoninérgico del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del raquí sobre los mecanismos neuroendócrinos que modulan pubertad y primera ovulación en la rata.

## **METAS**

1.-Describir las variaciones en las concentraciones de serotonina, noradrenalina, dopamina y algunos de sus metabolitos (5-HIAA, MHPG, DOPAC), en el hipotálamo de animales en las etapas neonatal, infantil, juvenil y peripuberal.

2.-Describir la actividad de las neuronas serotoninérgica, dopaminérgica y noradrenérgica en el hipotálamo de ratas sacrificadas en las etapas neonatal, infantil, juvenil y peripuberal.

3.-Comparar los efectos de la lesión del núcleo dorsal del rafé, realizada en las etapas infantil o juvenil, sobre la edad de la apertura, primer estro vaginal y la primera ovulación.

4.-Medir las concentraciones de serotonina, dopamina, noradrenalina y algunos de sus metabolitos (5-HIAA, MHPG, DOPAC), en el hipotálamo de animales con lesión en el núcleo dorsal del rafé realizada en las etapas infantil o juvenil.

5.-Comparar los efectos de la lesión del núcleo dorsal del rafé realizada en las etapas infantil o juvenil, sobre la actividad de las neuronas serotoninérgica, dopaminérgica y noradrenérgica del hipotálamo.

6.-Estudiar los efectos de la lesión del núcleo dorsal del rafé realizada en las etapas infantil o juvenil, sobre el crecimiento folicular y el proceso de atresia del ovario.

7.-Analizar la respuesta ovulatoria del animal con lesión del núcleo dorsal del rafé al final de la fase juvenil, al estímulo con gonadotropina exógena.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Procedimientos Generales**

Se utilizaron ratas hembras recién nacidas, en diferentes etapas del desarrollo prepuberal y en el momento de la pubertad, de la cepa CII-ZV, las cuales fueron mantenidas en condiciones controladas de iluminación con 14 h de luz y 10 h de obscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso a la madre hasta el destete (día 21 de vida) y al alimento (Nutri-Cubos, Ralston Rations USA) y al agua desde ese momento hasta el sacrificio.

Se colocaron 6 crías por camada (cinco hembras y un macho), para evitar que la disponibilidad del alimento modificara el desarrollo del animal, ya que se ha mostrado que la deficiencia nutricional en los primeros estadios de vida, influyen en la maduración del sistema nervioso central y sexual del animal (Salas et al, 1991). Además, durante el tiempo en que los animales permanecieron con sus madres en el nido no se marcaron, ni manipularon para evitar que, en la madre se incrementara la actividad del lamido del área urogenital de sus crías y se provocaran cambios en la edad de inicio de la apertura vaginal. El incremento en esta actividad en la madre provoca cambios en la maduración reproductiva (Salas Torreno, 1991 ).

### **Procedimiento de autopsia**

Los animales fueron sacrificados por decapitación, entre las 08.00 y las 09.30 a.m. A la autopsia se disecaron los ovarios y el útero, los que se pesaron en balanza de precisión. Se buscó la presencia de ovocitos en las trompas uterinas y cuando estuvieron presentes se les contó con la ayuda de un microscopio estereoscópico. El peso de los órganos se expresó en miligramos (pesos absolutos).

### **Medición de serotonina, dopamina, noradrenalina, 5-HIAA, DOPAC y MHPG.**

A cinco animales de cada grupo experimental se les extrajo el cerebro, el que se colocó en solución salina helada (0 °C), se disecó el hipotálamo, y este último se almacenó a -70 °C hasta la cuantificación de la serotonina (5-HT), las catecolaminas (dopamina (DA) y noradrenalina (NA)) y sus respectivos metabolitos (ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletenglicol (MHPG por sus siglas en inglés), ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC por sus siglas en inglés) y el ácido 5-hidroxí-indolacético (5-HIAA por sus siglas en inglés) por cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) (Hadfield et al, 1985).

Para la disección del hipotálamo se consideraron los límites descritos por Blejer, y Siggelkow, (1979), rostralmente el quiasma óptico, la banda diagonal de Broca, comisura anterior y núcleo acumbens; lateralmente la sustancia innominata, el globus pallidus y los surcos hipotalámicos laterales; caudalmente por los cuerpos mamilares dorsalmente la profundidad del corte fue de 3 mm.

El hipotálamo se pesó en balanza de precisión al 0.1 mg, se homogeneizó en ácido perclórico al 0.1 N en frío y se centrifugó a 12000 r.p.m. durante 30 minutos a -4 °C. El sobrenadante se filtró con papel de poro de 0.2 µm. La fracción así obtenida fue inyectada en el sistema de cromatografía que consistió de una bomba, un detector electroquímico (Bioanalytical system), modelo LC4, en condiciones que fueron previamente descritas (Hadfield et al, 1985). Los resultados de la concentración de los neurotransmisores y sus metabolitos fueron expresados en ng/mg de tejido.

Se ha reportado que la actividad de la neurona serotoninérgica se puede estimar por los siguientes criterios (Shannon et al, 1986):

- 1).-Concentración de su metabolito, el 5-HIAA.

- 2).-La relación [ 5-HIAA]/[5-HT].
- 3).-La tasa de acumulación del 5-hidroxitriptofano, después de la administración de un inhibidor de la transformación de este a serotonina.
- 4).-La tasa de acumulación de serotonina.
- 5).-La tasa de disminución del 5-HIAA después de la admistración de un inhibidor de la monoamino oxidasa (enzima que degrada la 5-HT en 5-HIAA).

Al parecer los tres primeros, son índices validos para estimar la actividad de la neurona, debido a que las dos primeras representa la tasa de utilización del neurotransmisor y la tercera es un índice de la tasa de síntesis de la amina. Por ello, se consideró como actividad de la neurona serotoninérgica, dopaminérgica y noradrenérgica, la relación propuesta por Kerdelhue et al (1989) y Shannon et al (1986).

$$\text{Actividad neuronal} = \frac{\text{[Metabolito del neurotransmisor]}}{\text{[Neurotransmisor]}}$$

### **Estudio de la población folicular**

El análisis de la población folicular se efectuó en el ovario derecho e izquierdo de tres animales de cada grupo experimental, tomados al azar. Los ovarios fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en parafina, se realizaron cortes seriados a 10 µm, teñidos con hematoxilina-eosina. Se revisaron todos los cortes y con la ayuda de un ocular micrométrico se midió el diámetro mayor y el perpendicular a éste, en todos los folículos que presentaron bien definidos el núcleo y el nucléolo del ovocito. Con el valor de los diámetros medidos de cada folículo se calculó el diámetro promedio y fueron clasificados según los parámetros propuestos por Hirshfield y Migdley (1978) en las siguientes categorías:

- 1).-Folículos pequeños: diámetro  $<350 \mu\text{m}$
- 2).-Folículos medianos: diámetro  $350-500 \mu\text{m}$
- 3).-Folículos preovulatorios: diámetro  $>500 \mu\text{m}$

Independientemente de su diámetro, los folículos se consideraron atrésicos cuando se presentó al menos una de las siguientes características: picnosis de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa en el antro folicular, engrosamiento de la teca, alteración del ovocito (Hsueh et al, 1994).

### **Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos de la edad de la apertura y del primer estro vaginal, el número de ovocitos liberados por animal ovulante y el número de folículos, se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis. El peso corporal y de los órganos, el diámetro promedio de los folículos sanos y atrésicos, la concentración de serotonina, catecolaminas, de sus metabolitos y de la actividad neuronal se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. Los resultados de la tasa de animales ovulantes se analizaron por la prueba de probabilidad exacta de Fisher o por  $Ji^2$ . Sólo se consideraron significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue igual o menor al 5 %.

## **1.- Estudio de la ontogenia del sistema serotoninérgico del hipotálamo a partir del nacimiento hasta el primer estro vaginal.**

Este experimento fue diseñado para analizar si existen variaciones en la concentración de la serotonina, catecolaminas y de la actividad neuronal del sistema serotoninérgico en el hipotálamo durante el desarrollo posnatal de la rata hembra.

Para ello ratas recién nacidas, de dos, cuatro, seis, ocho, diez, doce, catorce, dieciséis, dieciocho, veintiuno, 26, 28, 30, 32, 34, 36 y 37 días de edad fueron sacrificadas y en el hipotálamo se cuantificó la concentración de serotonina, catecolaminas y sus metabolitos (Hadfield et al, 1985). Otro grupo de animales fue controlado diariamente hasta que se presentó la apertura vaginal y a partir de ese momento se tomaron frotis vaginales diarios, los que fueron teñidos con hematoxilina-eosina y analizados al microscopio. Un grupo de animales fueron sacrificados en el día que presentaron el primer estro vaginal (día  $37.5 \pm 0.4$ ).

## **RESULTADOS**

### **1. Sistema serotoninérgico**

La concentración de serotonina en el hipotálamo aumentó significativamente desde el día dos hasta el día ocho de vida y se mantuvo en esas concentraciones hasta el día catorce. En el día dieciséis se observó una disminución significativa respecto a los días anteriores. A partir del día dieciocho se presentó un aumento y en el día 26 se alcanzaron concentraciones similares a las de los días ocho a catorce. En los dos días previos al primer estro vaginal, la concentración de serotonina hipotalámica volvió a descender. La concentración de 5-HIAA no mostró cambios paralelos a los de la amina, ya que aumentó en forma constante desde el

nacimiento hasta el día 34. Las modificaciones en la concentración del metabolito se hicieron paralelas con las del neurotransmisor en los días previos inmediatos al primer estro vaginal (Fig. 3). Este no paralelismo en las concentraciones del neurotransmisor y su metabolito se evidencian claramente al analizar la actividad de la neurona serotoninérgica.

La actividad de la neurona serotoninérgica presentó variaciones a lo largo del desarrollo posnatal del animal. En los días posteriores al nacimiento la actividad fue alta, pero después disminuyó y en el día dieciséis se incrementó para volver a disminuir. En el día veintiuno la actividad de la neurona es intermedia y disminuyó nuevamente en los días 24 y 26, mientras, que en el 30 presentó la máxima actividad y al primer estro vaginal disminuyó ligeramente (Fig. 3).

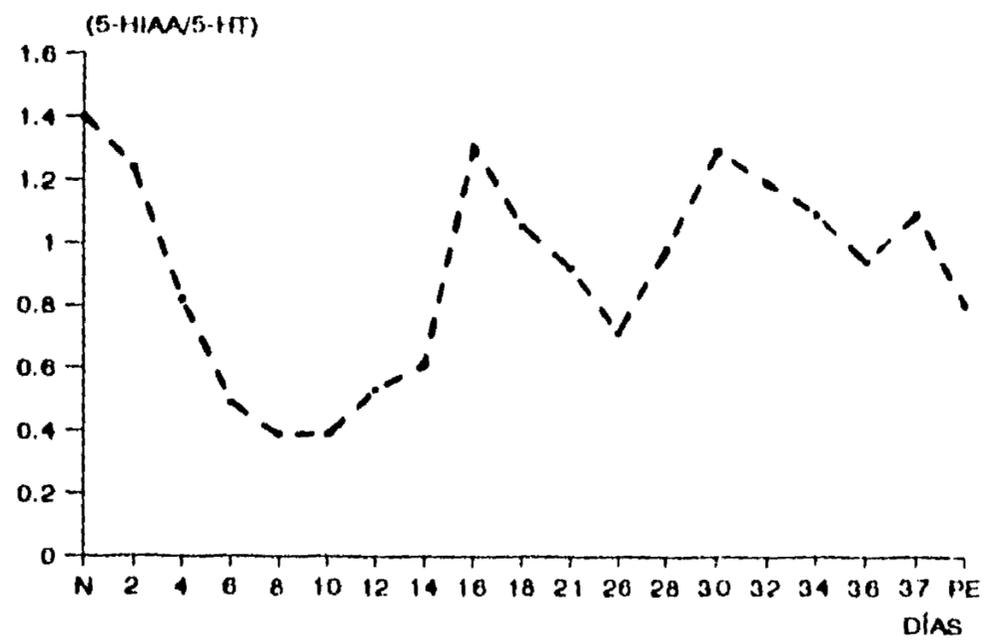
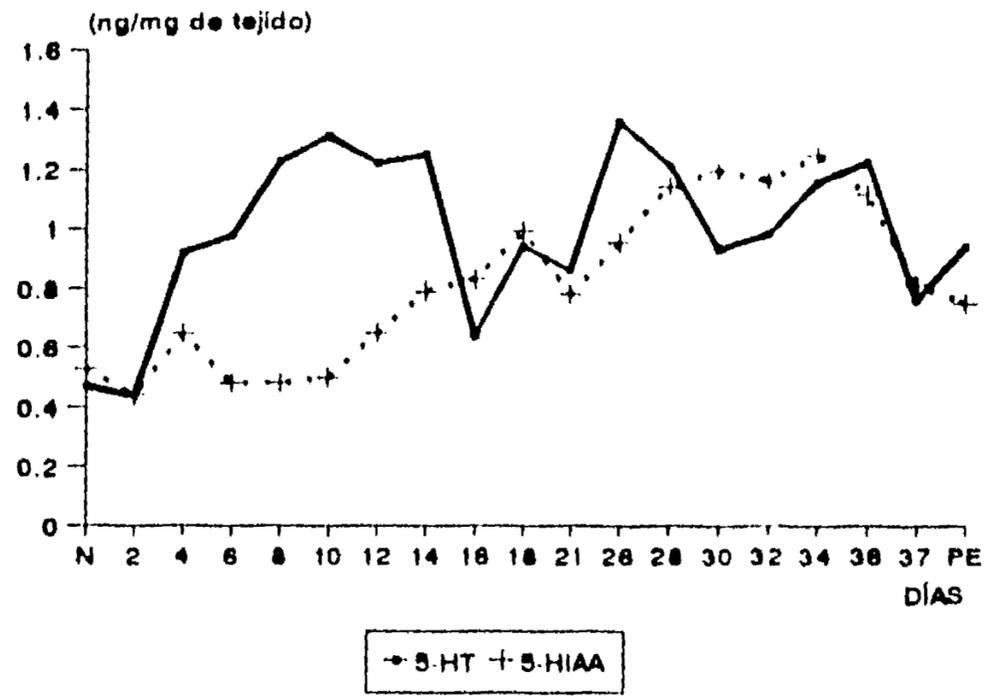


Fig. 3. Media de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y de la actividad de la neurona serotoninérgica (5- HIAA/5-HT) en el hipotálamo de ratas hembras sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

## 2. Sistema dopaminérgico

La concentración de DA y DOPAC en el hipotálamo de los animales sacrificados en la etapa neonatal, estuvo por debajo de la sensibilidad del método (0.01 ng). A partir del día doce se detectó DA y DOPAC y en el 28 se observó un aumento significativo, para después disminuir. En el día del primer estro vaginal la concentración de este neurotransmisor fue muy baja y la de su metabolito, fue ligeramente menor a la DA. En los dos días previos a la apertura vaginal se mantuvo baja y se incrementó en al primer estro vaginal (Fig. 4).

La actividad de la neurona dopaminérgica no presentó grandes variaciones del día doce hasta los días previos a la apertura vaginal, con excepción de un ligero aumento en el 36. En el día del primer estro vaginal la relación DOPAC/DA se incrementó significativamente (Fig. 4).

## 3. Sistema noradrenérgico

La concentración de NA en el hipotálamo aumentó conforme la edad del animal. En el día catorce se observó un incremento significativo, para después disminuir ligeramente y aumentar nuevamente en el día 28 y se mantuvo constante hasta el 36. En el día del primer estro vaginal, la concentración de la NA aumentó significativamente respecto a los días anteriores. Durante el desarrollo del animal no se observó paralelismo en la concentración de NA y su metabolito, ya que este no se detectó a partir del nacimiento hasta el día diez, y mientras que su concentración aumentó ligeramente desde el día 26 y permaneció constante hasta el día de la apertura vaginal. La actividad de la neurona noradrenérgica fue semejante a lo largo del desarrollo del animal (Fig. 5).

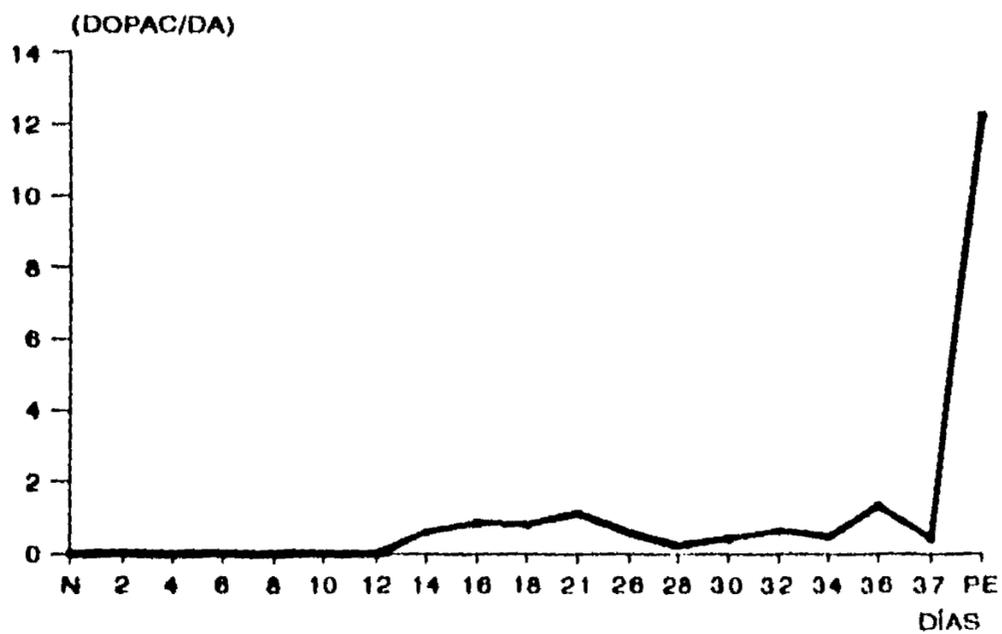
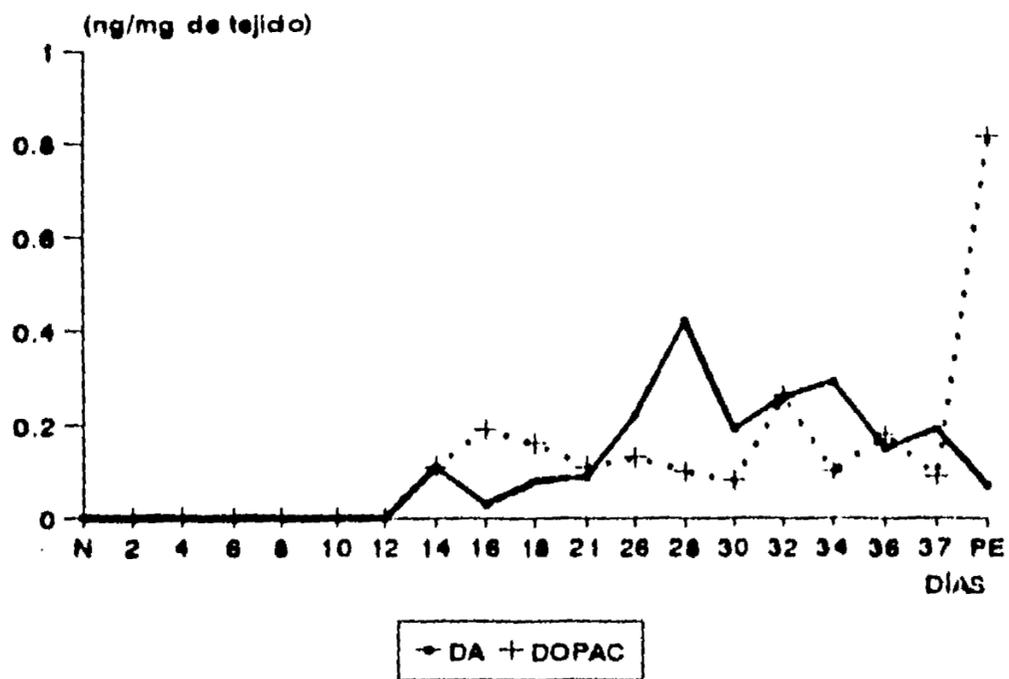


Fig. 4. Media de la concentración (ng/mg de tejido) de dopamina (DA) y del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y de la actividad (DOPAC/DA) de la neurona dopaminérgica en el hipotálamo de ratas hembras sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

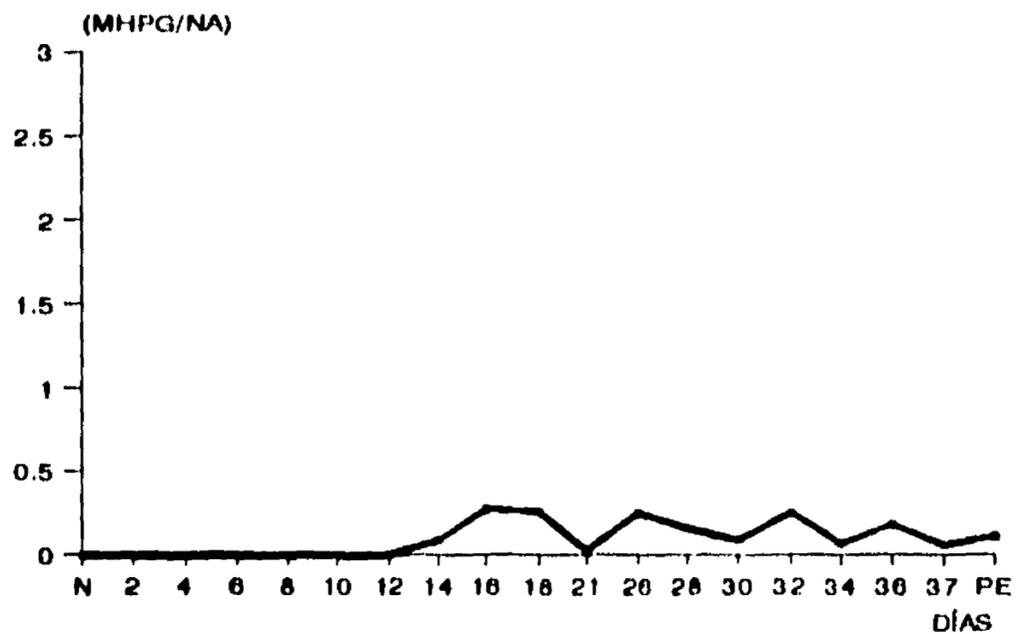
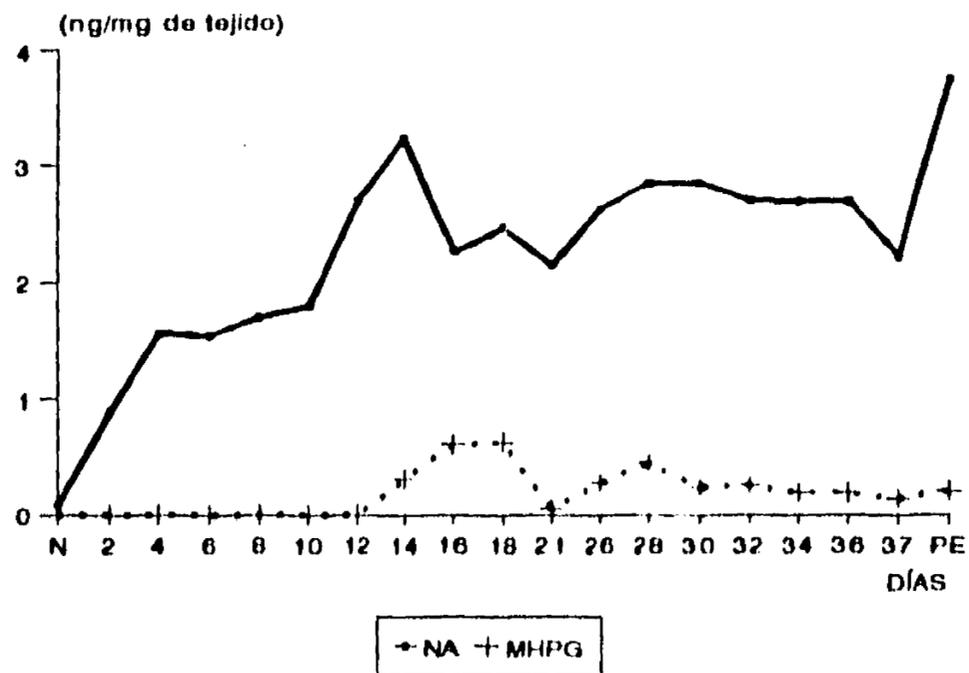


Fig. 5. Media de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y del ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletílicol (MHPG) y de la actividad de la neurona noradrenérgica (MHPG/NA) en el hipotálamo de ratas hembras durante el desarrollo prepuberal.

### Peso corporal y de órganos

En la figura 6 se muestran los cambios en el peso corporal y del ovario desde el nacimiento hasta el día del primer estro vaginal. Se observa que el peso de los animales fue siempre en aumento, siendo este incremento más evidente desde el día 21 hasta el día en que el frotis vaginal presentó características de estro. En los primeros días los cambios en el peso del ovario no son paralelos al crecimiento de los animales, en cambio a partir del día 26 hasta el primer estro vaginal el peso de la gónada muestra un aumento más o menos paralelo con el del peso corporal.

Las modificaciones del peso del útero en función de la edad de los animales, desde el nacimiento hasta el día 34 del desarrollo, son paralelos con los cambios en el peso corporal. Sin embargo, el peso del útero aumentó en los días cercanos a la apertura vaginal y al primer estro tal aumento fue mayor (Fig. 6).

Estos resultados muestran que durante el desarrollo prepuberal del animal existen variaciones en la concentración de serotonina y de la actividad de este sistema de neurotransmisión. Posiblemente los cambios observados están vinculados con la maduración de los mecanismos neuroendócrinos del eje hipotálamo-hipófisis-gónada que culmina con el inicio de la pubertad y primera ovulación.

Además, se observa que la actividad de la neurona serotoninérgica es alta al final de la fase infantil (día 21) y juvenil tardía (día 30), pero es menor en la juvenil (alrededor de los días 24 y 27). Con base en estos resultados se decidió analizar los efectos de la lesión del núcleo dorsal del raquídeo, realizada en las etapas infantil o juvenil, sobre la edad de la apertura y del primer estro vaginal y de la primera ovulación.

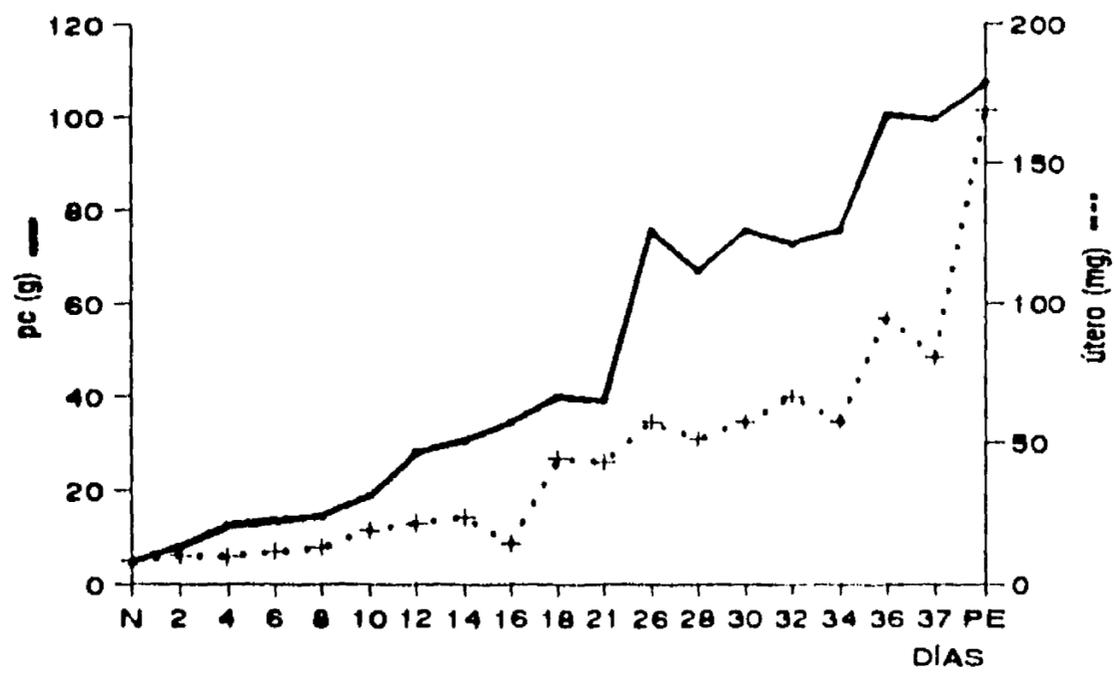
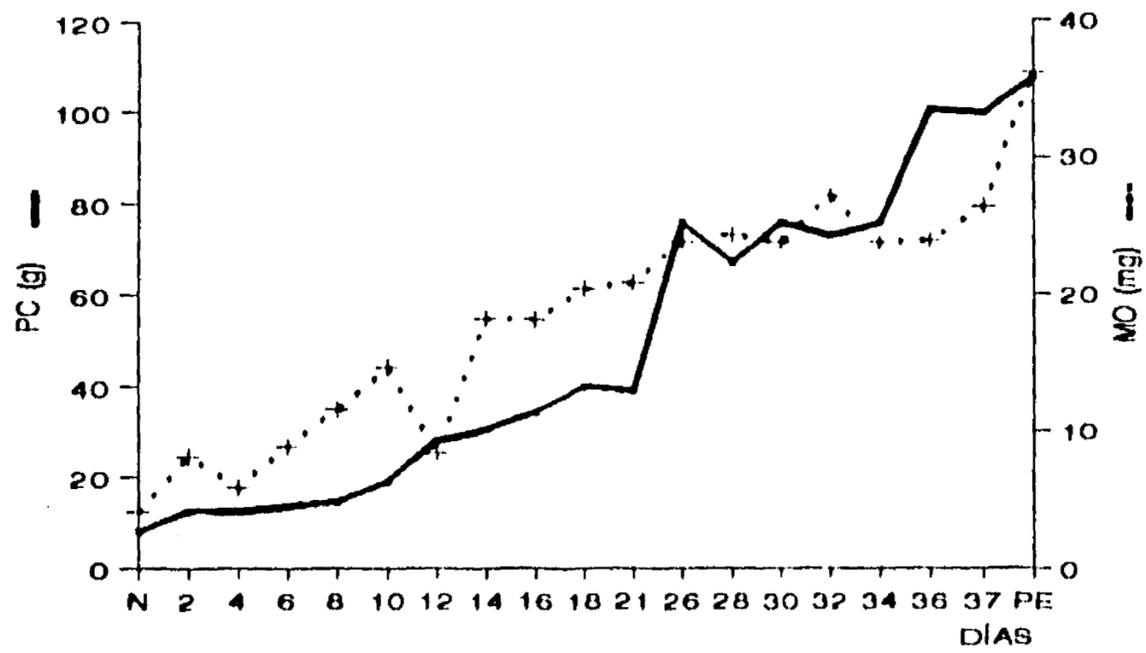


Fig. 6. Media del peso corporal (g), del ovario (mg) y del útero de ratas hembra absoluto sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

## **2.- Estudio de los efectos de la lesión del núcleo dorsal del rafe, en la etapa infantil y juvenil, sobre la ovulación espontánea.**

Con el fin de analizar si la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe, resulta en modificaciones del inicio de la pubertad (lo que estaría vinculado a influencias estimuladoras o inhibitorias sobre la secreción de las gonadotropinas y de las hormonas ováricas), se estudiaron los efectos de la lesión electrolítica del núcleo dorsal del rafe realizada en animales al final de la fase infantil o a la mitad y al final de la etapa juvenil, sobre la pubertad espontánea y la primera ovulación.

Para ello, se utilizaron ratas hembras de 21 (fase infantil), 24, 27 ó 30 días de edad (fase juvenil) a los cuales se les realizó la lesión electrolítica del núcleo dorsal del rafe y fueron sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

### **PROCEDIMIENTO DE LESIÓN**

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (40 mg/kg. peso) por vía intraperitoneal (i.p.), seguido de anestesia complementaria con éter cuando fue necesario. Los animales se montaron en un aparato estereotáxico, se seccionó piel, se perforó el cráneo con una fresa odontológica, el electrodo con una inclinación de 30°, (conectado a un generador de lesiones por radiofrecuencia), se introdujo hasta alcanzar el núcleo dorsal del rafe, siguiendo las coordenadas del atlas de Sherwood y Timiras (1970). Para realizar la lesión completa se llegó al área correspondiente y se dejó que la punta del electrodo alcanzara una temperatura de 70 °C durante 5 segundos. Las coordenadas empleadas para introducir el electrodo hasta el sitio de lesión, en los animales de las diferentes edades fueron las siguientes: 21 días de edad (AP 0.4 mm, L 3.1 mm, DV 6.1mm); 24 días (AP 0.4 mm, L 3.1 mm, DV 6.2 mm); 27 días (AP 0.5 mm, L 3.2 mm, DV 6.2 mm) y 30 días (AP 0.7 mm, L 3.3 mm, DV 6.4 mm).

Como grupos testigo se utilizaron dos tipos de animales:

1. Ratas de las mismas edades, que fueron tratados como los animales lesionados, pero no se pasó corriente por el electrodo (operación simulada).
2. Animales sin tratamiento que fueron sacrificados en el día del primer estro vaginal (testigo absoluto).

El peso corporal inicial de los animales que conformaron los grupos con operación simulada o con lesión del núcleo dorsal del raqué fue similar en cada edad (21 días:  $48.8 \pm 1.55$ ,  $45.3 \pm 1.3$ ; 24 días  $56.6 \pm 1.1$ ,  $57.8 \pm 1.1$ ; 27 días  $63.2 \pm 0.7$ ,  $62.0 \pm 0.8$ ; 30 días  $70.2 \pm 1.0$ ,  $70.0 \pm 1.2$ , respectivamente)

Para localizar la trayectoria del electrodo y el sitio de lesión de los animales de los diferentes grupos, a la autopsia el cerebro de los animales se fijo en formol al 10 % durante 24 h y se realizaron cortes seriados a  $120 \mu\text{m}$  de espesor en el crióstato y se tiñeron con violeta de cresilo (Luna, 1975)

Otros grupos de animales con lesión del núcleo dorsal del raqué, con operación simulada ó testigo absoluto, a la autopsia se disecó y pesó el hipotálamo y se cuantificó la concentración de serotonina, catecolaminas y sus respectivos metabolitos. En los ovarios de los animales de los distintos grupos se realizó el estudio de la población folicular.

## **RESULTADOS**

La operación simulada realizada a cualquier edad provocó retraso de la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal, pero no se observaron diferencias significativas en la tasa de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados por animal ovulante, ni en el peso corporal y de los ovarios. El peso del

útero únicamente se modificó en el grupo con operación simulada efectuada en el día 21 (Tablas I y II).

**Tabla I. Edad de la apertura vaginal (EAV), del primer estro (EPE) (días), número de ovocitos liberados (media  $\pm$  e.e.m.) y tasa ovulatoria (Número de animales ovulantes/número total de animales) de ratas testigo absoluto (TA) o con operación simulada (OS) a diferentes edades y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

<b>GRUPO</b>	<b>EAV</b>	<b>E PE</b>	<b>TASA DE ANIMALES OVULANTES</b>	<b>NUMERO DE OVOCITOS</b>
<b>TA</b>	36.9 $\pm$ 0.3	37.5 $\pm$ 0.39	20/24	7.1 $\pm$ 0.3
<b>OS 21 DÍAS</b>	39.9 $\pm$ 1.03	41.0 $\pm$ 0.75 *	7/9	8.0 $\pm$ 0.6
<b>OS 24 DÍAS</b>	41.6 $\pm$ 0.92 *	42.1 $\pm$ 0.94 *	13/14	7.4 $\pm$ 0.4
<b>OS 27 DÍAS</b>	41.2 $\pm$ 0.78 *	42.2 $\pm$ 0.85 *	8/13	7.7 $\pm$ 0.4
<b>OS 30 DÍAS</b>	42.0 $\pm$ 0.39 *	42.6 $\pm$ 0.46 *	12/16	7.5 $\pm$ 0.4

\* p<0.05 vs. grupo TA (Prueba de Kruskal-Wallis).

**Tabla II. Mediate.e.m. del peso corporal (g), de los ovarios y del útero (mg) de ratas testigo absoluto (TA) o con operación simulada (OS) a diferentes edades y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

<b>GRUPO</b>	<b>PESO CORPORAL</b>	<b>OVARIOS</b>	<b>UTERO</b>
<b>TA</b>	107.3 $\pm$ 1.5	36.1 $\pm$ 1.3	169.3 $\pm$ 5.7
<b>OS 21 DÍAS</b>	113.9 $\pm$ 3.6	36.9 $\pm$ 2.2	128.4 $\pm$ 7.4 *
<b>OS 24 DÍAS</b>	114.1 $\pm$ 8.1	31.0 $\pm$ 5.6	160.7 $\pm$ 26.5
<b>OS 27 DÍAS</b>	111.7 $\pm$ 3.6	32.2 $\pm$ 1.5	152.1 $\pm$ 7.6.
<b>OS 30 DÍAS</b>	113.7 $\pm$ 3.9	29.6 $\pm$ 1.8	146.6 $\pm$ 7.3.

\* p< 0.05. grupo TA (Prueba de ANDEVA seguida de Tukey).

La concentración de NA en el hipotálamo no se modificó en los diferentes grupos con operación simulada, en cambio la concentración de su metabolito aumentó cuando la operación se efectuó en el día 30. En los animales de 21 y 27 días, la cantidad de DA aumentó y la de DOPAC disminuyó independientemente de la edad (Tabla III). La concentración de serotonina y su metabolito no se modificaron por la operación simulada.

**Tabla III. Mediate.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), 4, hidroxí-3-metoxifeniletínglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) de ratas testigo absoluto (TA) o con operación simulada (OS) a diferentes edades y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

<b>GRUPO</b>	<b>NA</b>	<b>MHPG</b>	<b>DA</b>	<b>DOPAC</b>
<b>TA</b>	3.74±0.31	0.21±0.07	0.07±0.005	0.81±0.04
<b>OS 21 DÍAS</b>	2.60±0.27	0.17±0.007	0.34±0.07 *	0.14±0.03 *
<b>OS 24 DÍAS</b>	3.76±0.48	0.29±0.06	0.29±0.07.	0.15±0.09 *
<b>OS 27 DÍAS</b>	2.16±0.18	0.20±0.01	0.98±0.02 *	0.09±0.001 *
<b>OS 30 DÍAS</b>	3.15±0.49	0.45±0.25 *	0.22±0.009	0.17±0.09 *

\* p<0.05 vs. grupo TA (Prueba de ANDEVA seguida de Tukey).

Debido a que los animales con operación simulada a los 21, 24, 27 ó 30 días, sacrificados en el día del primer estro vaginal, presentaron diferencias significativas en comparación con los animales del grupo testigo absoluto, en algunos de los parámetros estudiados, los efectos producidos por la lesión del núcleo dorsal del rafé fueron comparados con los del grupo de operación simulada correspondiente.

La lesión del núcleo dorsal del rafé se extendió rostralmente desde el borde caudal del núcleo del nervio tracalis y parte de la sustancia gris periacueductual y

caudalmente abarcó los límites de la sustancia gris periacueductual (Fig. 7). Lateralmente abarcó los límites de la sustancia gris periacueductual y ventralmente con el borde dorsal del fascículo longitudinal medial, además la lesión abarcó en su totalidad al núcleo dorsal del rafé (Fig. 8).

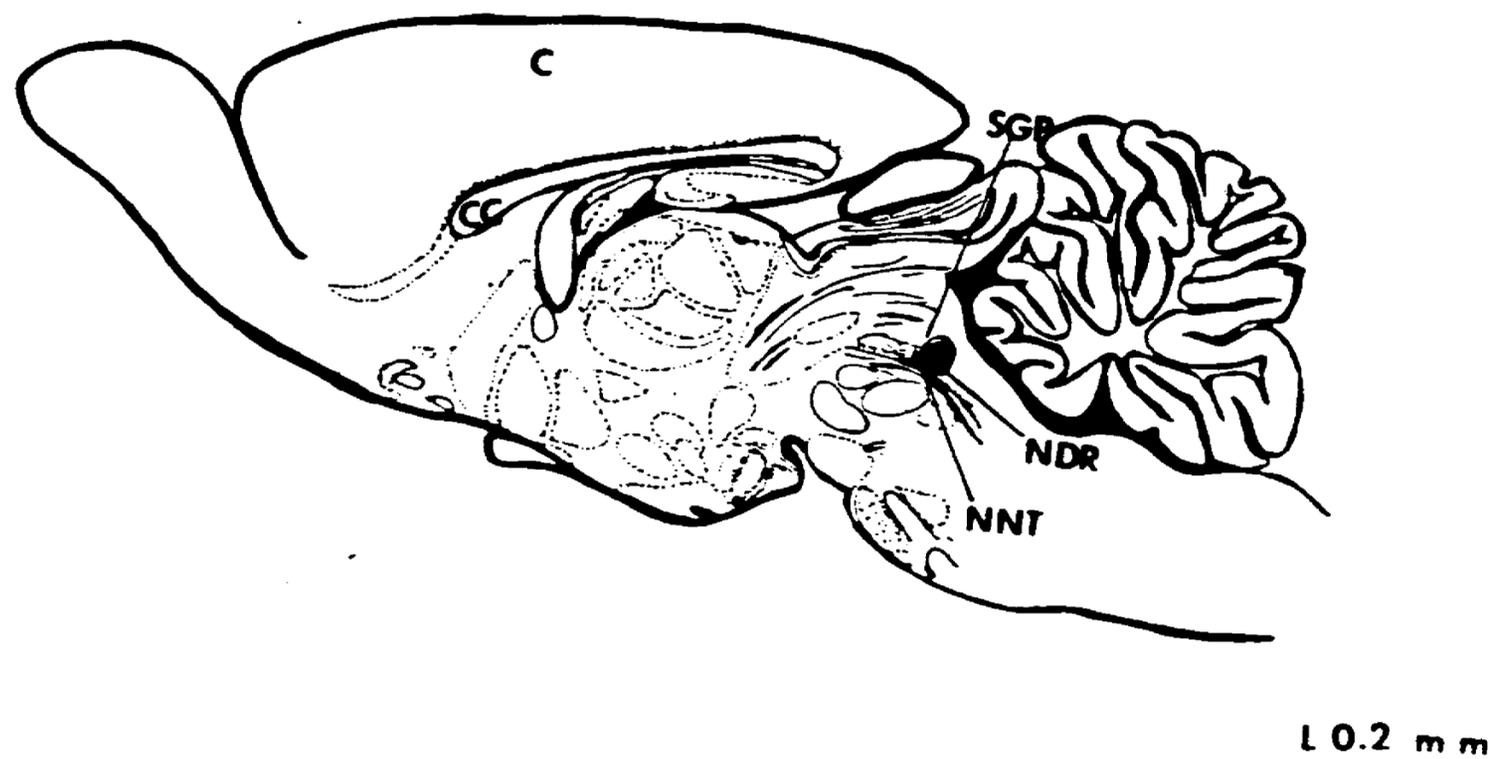
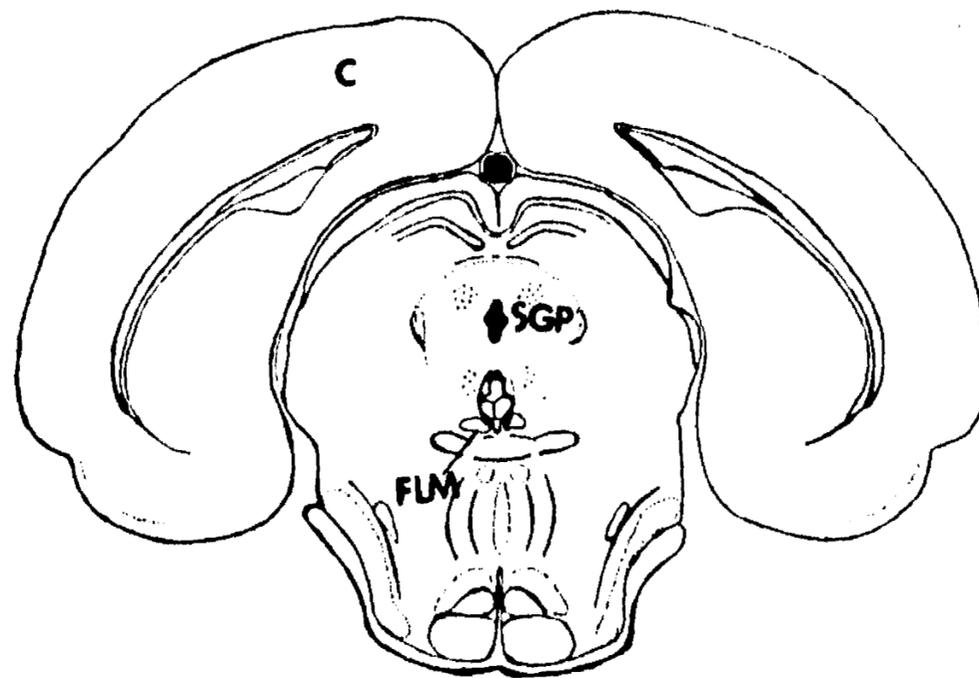
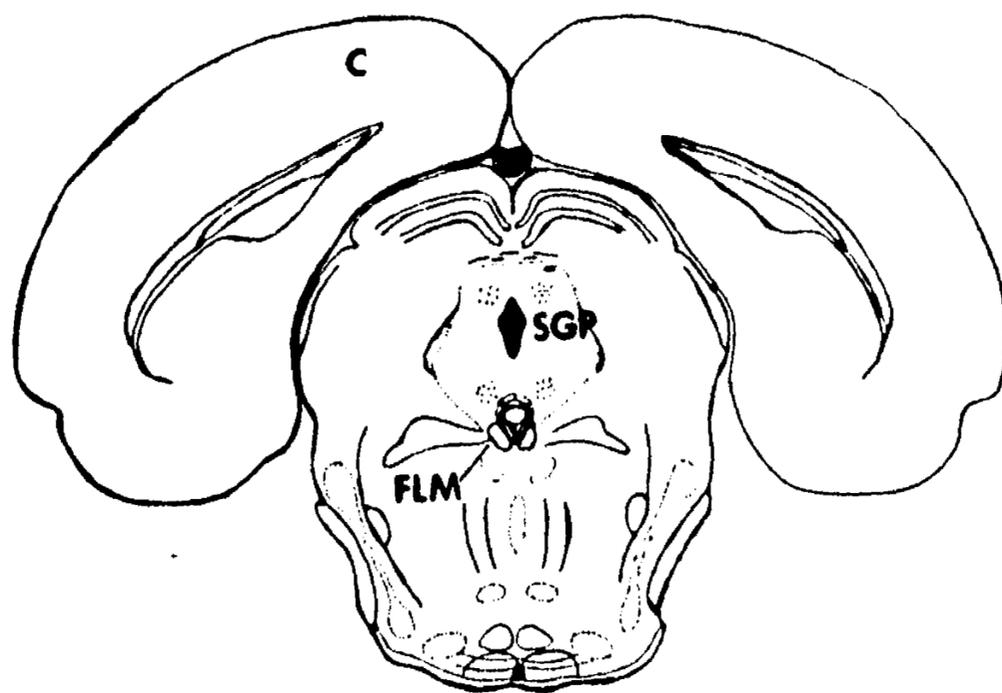


Fig. 7. Representación esquemática de la extensión de la lesión del núcleo dorsal del rafé en un corte sagital. El área sombreada representa la lesión. C: corteza; CC: cuerpo calloso; SGP: sustancia gris periacueductual; NNT: núcleo del nervio trocalis; NDR: núcleo dorsal del rafé (Tomado del Atlas de Sherwood y Timiras, 1970).



A0.0 m m



P0.4 m m

Fig. 8. Representación esquemática de la extensión de la lesión del núcleo dorsal del rafe en un corte coronal. El área sombreada representa la lesión. C: corteza; SGP: sustancia gris periacueductual; FLM: fascículo longitudinal medial; NDR: núcleo dorsal del rafe (Tomado del Atlas de Sherwood y Timiras, 1970).

### 1. Edad de apertura vaginal y edad del primer estro.

Las edades de apertura y del primer estro vaginal fueron significativamente mayores en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé, realizada en el día 21, mientras que no se observaron diferencias significativas en aquellos operados a los 24, 27 y 30 días de edad (Tabla IV).

**Tabla IV. Edad de apertura vaginal (EAV) y edad del primer estro vaginal (EPE) (mediana.e.m) de ratas con operación simulada (OS) o lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) a diferentes edades del desarrollo prepuberal y sacrificadas al primer estro vaginal.**

GRUPO	n	EAV	EPE
<b>21 DÍAS</b>			
OS	9	39.9±1.03	41.0±0.75
LNDR	12	45.6±0.94	46.6±0.90 *
<b>24 DÍAS</b>			
OS	14	41.6±0.92	42.1±0.94
LNDR	12	40.8±0.94	42.5±1.03
<b>27 DÍAS</b>			
OS	13	41.2±0.78	42.2±0.85
LNDR	10	41.0±0.56	43.0±0.52
<b>30 DÍAS</b>			
OS	16	42.0±0.39	42.6±0.46
LNDR	14	42.2±0.66	43.1±0.61

\* p<0.05 vs. grupo con OS (Prueba de Kruskal-Wallis).

### 2. Tasa de animales ovulantes y número de ovocitos liberados.

Ninguno de los animales lesionados en el día 30 de edad ovuló en el día de su primer estro vaginal. En cambio, en los animales en los que la lesión se realizó a los 21, 24 ó 27 días de edad, la proporción de animales que ovularon al primer estro vaginal fue similar a su respectivo grupo con operación simulada. El número de ovocitos liberados por animal ovulante aumentó significativamente en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé efectuada a los 24 y 27 días de edad (Tabla V).

animales con lesión del núcleo dorsal del rafé efectuada a los 24 y 27 días de edad (Tabla V).

**Tabla V. Tasa de animales ovulantes (número de animales ovulantes/número total de animales) y media  $\pm$  e.e.m. del número de ovocitos liberados por ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) a diferentes edades del desarrollo prepuberal y sacrificadas el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	TASA DE ANIMALES OVULANTES	NUMERO DE OVOCITOS
<b>21 DÍAS</b>		
OS	7/9	8.0 $\pm$ 0.6
LNDR	6/12	7.0 $\pm$ 0.4
<b>24 DÍAS</b>		
OS	13/14	7.4 $\pm$ 0.4
LNDR	10/12	9.7 $\pm$ 0.4 &
<b>27 DÍAS</b>		
OS	8/13	7.7 $\pm$ 0.4
LNDR	10/10	9.5 $\pm$ 0.5 &
<b>30 DÍAS</b>		
OS	12/16	7.5 $\pm$ 0.4
LNDR	0/14 *	0

\* p<0.05 vs. grupo con OS (Prueba de Fisher).

& p<0.05 vs. grupo con OS (Prueba de Kruskal-Wallis)

### 3. Peso corporal y de órganos.

En relación con su grupo con operación simulada, el peso corporal, de los ovarios y del útero de los animales lesionados en el núcleo dorsal del rafé a los 30 días de edad fue significativamente menor. Tales diferencias no ocurrieron en los animales operados a los 21, 24 ó 27 días (Tabla VI).

**Tabla VI. Peso corporal (g) de los ovarios y del útero (mg) (media  $\pm$  e.e.m.) de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) a diferentes edades del desarrollo prepuberal y sacrificadas el día del primer estro vaginal.**

<b>GRUPO</b>	<b>n</b>	<b>PESO CORPORAL</b>	<b>OVARIOS</b>	<b>ÚTERO</b>
<b>21 DÍAS</b>				
OS	9	113.9 $\pm$ 3.6	36.9 $\pm$ 2.2	128.4 $\pm$ 7.4
LNDR	12	111.3 $\pm$ 4.1	29.5 $\pm$ 2.4	132.6 $\pm$ 10.8
<b>24 DÍAS</b>				
OS	14	114.1 $\pm$ 8.1	31.0 $\pm$ 5.6	160.7 $\pm$ 26.5
LNDR	12	111.8 $\pm$ 3.3	30.2 $\pm$ 1.6	149.1 $\pm$ 6.9
<b>27 DÍAS</b>				
OS	13	111.7 $\pm$ 3.6	32.2 $\pm$ 1.5	152.1 $\pm$ 7.6
LNDR	10	113.7 $\pm$ 1.2	35.4 $\pm$ 2.8	149.4 $\pm$ 7.4
<b>30 DÍAS</b>				
OS	16	113.7 $\pm$ 3.9	29.6 $\pm$ 1.8	146.6 $\pm$ 7.3
LNDR	14	100.6 $\pm$ 3.2 *	21.8 $\pm$ 1.4 *	117.2 $\pm$ 10.2 *

\*  $p < 0.05$  vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

#### 4. Población folicular.

Debido a que los resultados del diámetro folicular promedio y la distribución de los folículos por rango entre el ovario izquierdo y el derecho en cada grupo experimental fueron similares, el análisis comparativo de los resultados de la población folicular, se realizó agrupando los datos obtenidos en ambas gónadas para cada grupo experimental.

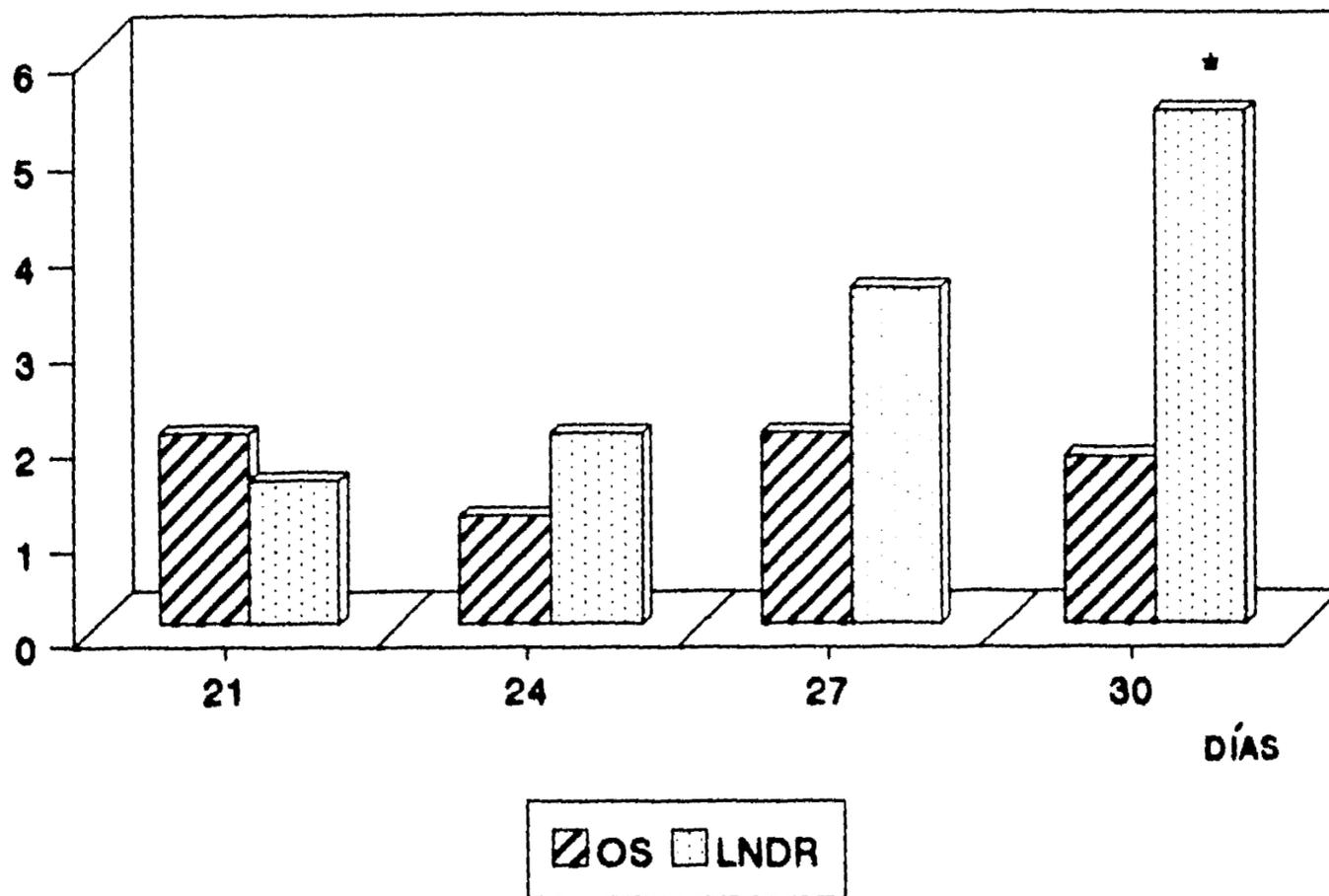
El diámetro promedio de los folículos de los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé no se modificó en ninguna de las edades estudiadas. El diámetro promedio de los folículos sanos y atrésicos de los ovarios de los animales con lesión fue semejante a los grupos con operación simulada. Sin embargo, se observó que en todos los grupos estudiados los folículos más grandes eran atrésicos.

En los ovarios de todos los grupos con lesión, el número promedio de los folículos cuantificados fue semejante a su respectivo grupo con operación simulada. Sin embargo, la distribución de folículos por tamaño muestra, con excepción de los animales operados al día 21, la tendencia al aumento en el número de folículos preovulatorios (>500  $\mu\text{m}$ ), siendo esta diferencia estadísticamente significativa cuando la destrucción del núcleo se realizó a los 30 días de edad (Tabla VII, Fig. 9). La lesión no modificó el número de folículos pequeños (<350  $\mu\text{m}$ ) y medianos (350-499  $\mu\text{m}$ ) presentes en cualquiera de las edades estudiadas. Todos los folículos preovulatorios de los ovarios de los animales con lesión realizada al día 30 de edad fueron atrésicos. En cambio, en los animales operados al día 24 ó 27 se observó la tendencia al incremento en el porcentaje de folículos sanos, lo que no llegó a ser estadísticamente significativa (Fig. 9).

**Tabla VII. Número de folículos (media  $\pm$  e.e.m.) en los ovarios de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) a diferentes edades del desarrollo prepuberal y sacrificadas el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	FOLÍCULOS TOTALES	DISTRIBUCIÓN POR RANGO		
		< 350 $\mu\text{m}$	350-500 $\mu\text{m}$	>500 $\mu\text{m}$
<b>21 DÍAS</b>				
OS	72.3 $\pm$ 3.9	63.6 $\pm$ 3.5	6.7 $\pm$ 1.1	2.0 $\pm$ 0.5
LNDR	78.0 $\pm$ 7.7	67.0 $\pm$ 7.2	9.2 $\pm$ 1.4	1.7 $\pm$ 0.8
<b>24 DÍAS</b>				
OS	107.8 $\pm$ 3.7	95.2 $\pm$ 4.2	10.8 $\pm$ 1.2	1.8 $\pm$ 0.4
LNDR	97.3 $\pm$ 8.4	86.8 $\pm$ 6.4	8.2 $\pm$ 1.5	2.3 $\pm$ 1.2
<b>27 DÍAS</b>				
OS	96.0 $\pm$ 5.2	81.5 $\pm$ 5.5	12.0 $\pm$ 1.6	2.5 $\pm$ 0.4
LNDR	81.7 $\pm$ 11.7	68.8 $\pm$ 9.7	9.0 $\pm$ 2.5	3.8 $\pm$ 0.8
<b>30 DÍAS</b>				
OS	86.8 $\pm$ 4.5	73.1 $\pm$ 4.5	11.7 $\pm$ 1.5	2.0 $\pm$ 0.4
LNDR	109.2 $\pm$ 9.8	94.7 $\pm$ 7.4	9.0 $\pm$ 2.8	5.5 $\pm$ 0.8 *

\*  $p < 0.05$  vs. grupo con OS (Prueba de Kruskal-Wallis).



\*  $P < 0.05$  vs OS

Fig. 9. Media del número de folículos preovulatorios atresicos de los ovarios de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) a diferentes edades del desarrollo prepuberal y sacrificadas el día del primer estro vaginal.

##### 5. Concentración de serotonina y catecolaminas.

La concentración de serotonina en el hipotálamo de los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé disminuyó de manera significativa, independientemente de la edad a la cual se realizó la destrucción del núcleo, mientras que la concentración de su metabolito el ácido 5-hidroxi-indolacético no se modificó. La actividad de la neurona serotoninérgica se incrementó en todos los animales con lesión del rafé el que fue mayor cuando la operación se efectuó a los 30 días de edad (Fig. 10).

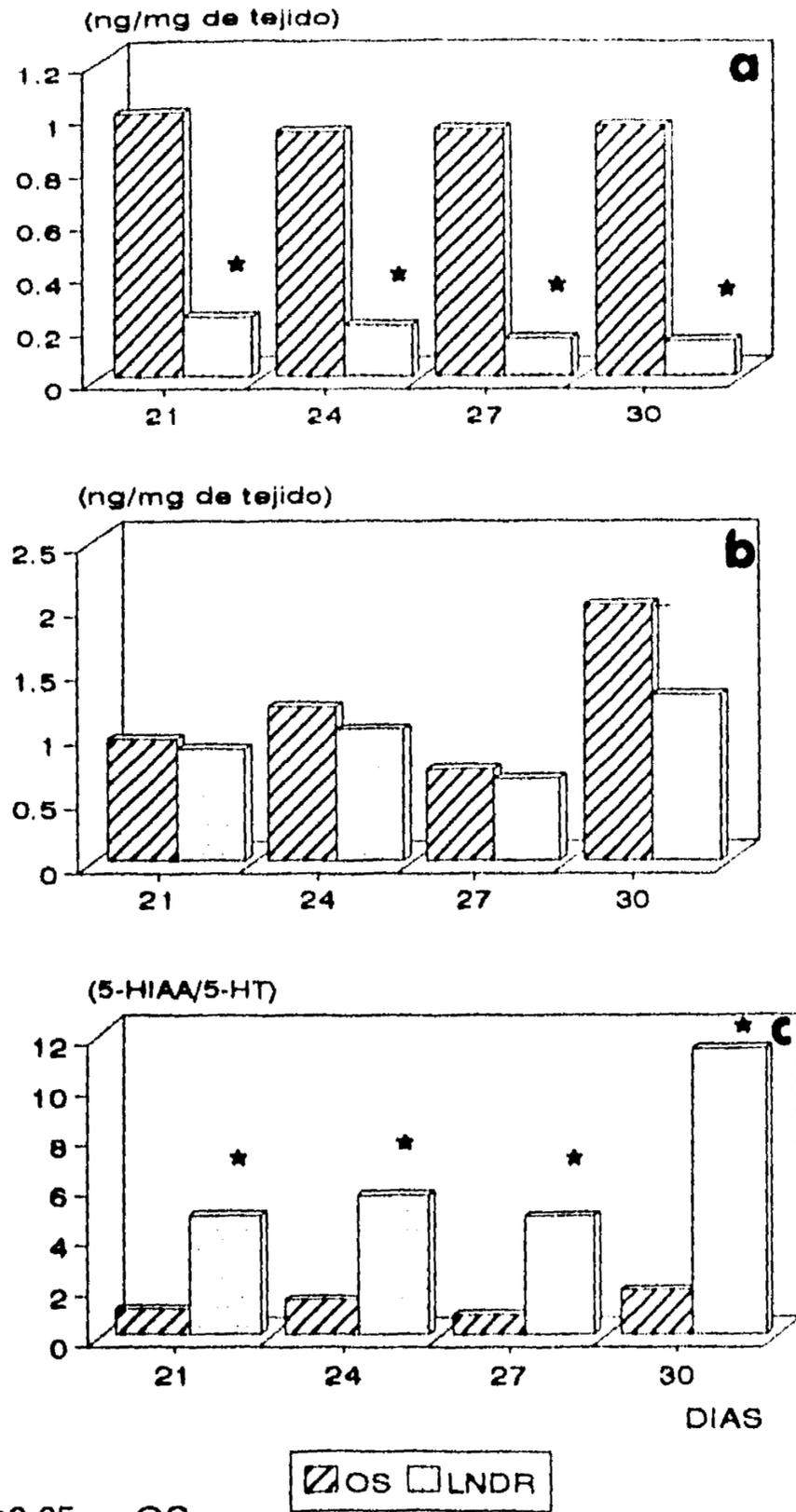


Fig. 10. Media de la concentración (ng/mg de tejido) de: a) serotonina (5-HT), b) ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y c) actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo de ratas hembras con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) a diferentes edades del desarrollo prepuberal y sacrificadas el día del primer estro vaginal.

La concentración de dopamina en el hipotálamo de los animales lesionados el día 24 y 27, disminuyó significativamente en relación a su grupo con operación simulada. Sin embargo, en los animales de 27 días con operación simulada o lesión del rafé, la concentración de DA fue mayor que en el día 24. Este parámetro no se modificó en el hipotálamo de los animales lesionados en las otras edades estudiadas. La concentración DOPAC no presentó cambios significativos en ninguno de los grupos de animales (tabla VIII). Estos hechos se reflejan en el análisis de la actividad de la neurona dopaminérgica, donde se observó la tendencia al aumento de la misma en los animales lesionados a los 21, 24 ó 30 días de edad, aunque no se alcanzó significación estadística (Tabla VIII).

**Tabla VIII. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) dopamina (DA) y del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y de la actividad de la neurona dopaminérgica en el hipotálamo de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) a diferentes edades del desarrollo prepuberal y sacrificadas el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	DA	DOPAC	ACTIVIDAD DE LA NEURONA
<b>21 DÍAS</b>			
OS	0.34 $\pm$ 0.07	0.14 $\pm$ 0.03	0.43 $\pm$ 0.09
LNDR	0.24 $\pm$ 0.11	0.25 $\pm$ 0.09	1.04 $\pm$ 0.32
<b>24 DÍAS</b>			
OS	0.29 $\pm$ 0.07	0.15 $\pm$ 0.09	0.51 $\pm$ 0.20
LNDR	0.08 $\pm$ 0.006 *	0.20 $\pm$ 0.06	2.63 $\pm$ 0.98 *
<b>27 DÍAS</b>			
OS	0.98 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.00	0.09 $\pm$ 0.002
LNDR	0.51 $\pm$ 0.04 *	0.1 $\pm$ 0.006	0.19 $\pm$ 0.01
<b>30 DÍAS</b>			
OS	0.22 $\pm$ 0.009	0.17 $\pm$ 0.09	0.78 $\pm$ 0.47
LNDR	0.19 $\pm$ 0.12	0.24 $\pm$ 0.03	1.26 $\pm$ 0.18

\*  $p < 0.05$  vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

La concentración de noradrenalina y su metabolito el MHPG en el hipotálamo de los animales lesionados en el núcleo dorsal del rafé, a los 21, 24 y 30 días de edad, no se modificó de manera significativa, en comparación con los

animales con operación simulada. En los animales lesionados en el día 27 de vida, se observó disminución significativa en la concentración de MHPG, lo que se reflejó en una menor actividad de la neurona noradrenérgica (Tabla IX).

**Tabla IX. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), del 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y de la actividad de la neurona noradrenérgica de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) en el hipotálamo de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal y sacrificadas el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	NA	MHPG	ACTIVIDAD DE LA NEURONA
<b>21 DÍAS</b>			
OS	2.60 $\pm$ 0.27	0.17 $\pm$ 0.007	0.06 $\pm$ 0.008
LNDR	4.01 $\pm$ 0.43	0.18 $\pm$ 0.02	0.05 $\pm$ 0.01
<b>24 DÍAS</b>			
OS	3.76 $\pm$ 0.48	0.29 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.02
LNDR	4.52 $\pm$ 0.15	0.20 $\pm$ 0.03	0.05 $\pm$ 0.008
<b>27 DÍAS</b>			
OS	2.16 $\pm$ 0.18	0.20 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.005
LNDR	3.13 $\pm$ 0.24	0.08 $\pm$ 0.04 *	0.02 $\pm$ 0.01 *
<b>30 DÍAS</b>			
OS	3.15 $\pm$ 0.49	0.45 $\pm$ 0.25	0.15 $\pm$ 0.04
LNDR	3.96 $\pm$ 0.17	0.49 $\pm$ 0.14	0.13 $\pm$ 0.04

\*  $p < 0.05$  vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Los resultados obtenidos en este estudio permiten suponer que durante el desarrollo del animal prepúber el sistema serotoninérgico del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé, participa de manera diferencial en los mecanismos neuroendócrinos que dan lugar a la primera ovulación. La falta de ovulación observada en los animales de 30 días con lesión del rafé dorsal, nos permite pensar que la información que se origina en este núcleo regula de manera estimulante la secreción de la LH, ya que ninguno de los animales con lesión ovuló, independientemente de que en el ovario se observaron folículos preovulatorios. Por lo que es posible que esta respuesta es una consecuencia de:

- Falta de secreción de LH
- Falta de respuesta del ovario a la LH
- Una combinación de ambos eventos

Para analizar este punto, se decidió realizar el siguiente experimento.

### **3. Efecto del reemplazo hormonal en animales con lesión del núcleo dorsal del rafé.**

Para estudiar si la falta de ovulación en los animales de 30 días con lesión del núcleo dorsal del rafé está vinculada a la falta de secreción del "pico preovulatorio" de la LH, en los animales de esta edad se efectuó la lesión del núcleo dorsal del rafé y se realizó el reemplazo hormonal con hCG.

Para ello, a ratas hembras de 30 días de edad con la lesión del núcleo dorsal del rafé, en el día 40 se les administró 10 u.i. de gonadotropina coriónica de mujer embarazada (hCG) (Sigma Chemical Co. St. Louis M.O. EE. UU.) por vía s.c. y se sacrificaron 20 horas después de la administración de la hormona.

Para analizar si el bloqueo de la ovulación en estos animales es una consecuencia de modificaciones en la presencia de los receptores a la hormona luteinizante, se decidió realizar la identificación por inmunocitoquímica de los receptores a la LH en el ovario de los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé en el día 30 (Bukovsky et al., 1993).

En un grupo de hembras de 30 días se efectuó la lesión del núcleo dorsal del rafé. Como grupo testigo se utilizaron animales con operación simulada o animales intactos. En todos los animales se registró la edad de la apertura vaginal y del primer estro, momento en el cual se realizó la autopsia. A la autopsia los ovarios fueron disecados, fijados en O.C.T. (Miles Inc. Elkhart, IN) y congelados en nitrógeno líquido. Las muestras fueron almacenadas en hielo seco a -70 °C hasta

la posterior cuantificación de los receptores a la LH, la cual fue realizado por el Dr. Bukovsky en la Universidad de Tennessee, Knoxville USA.

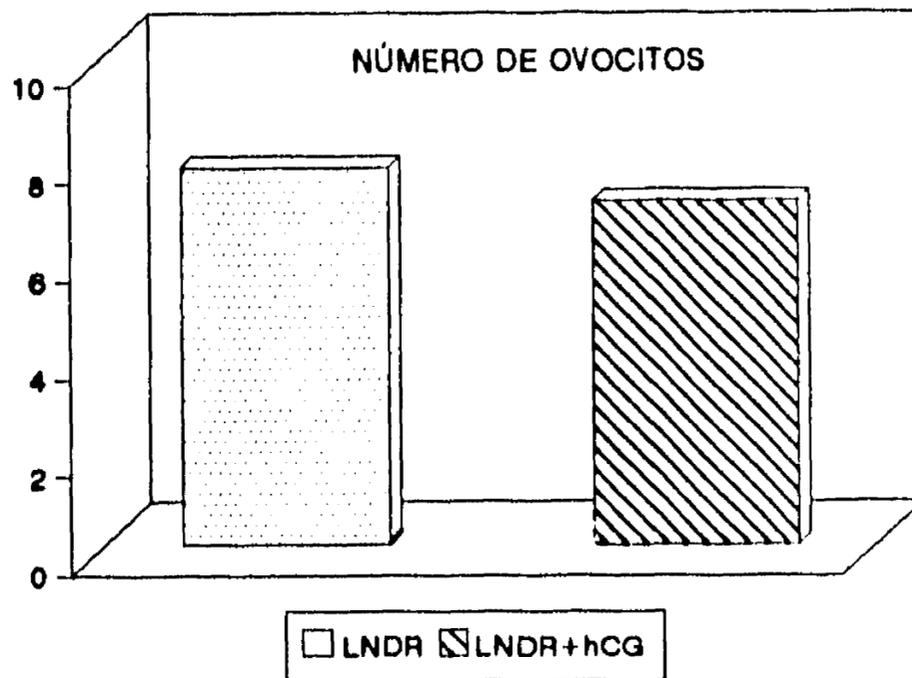
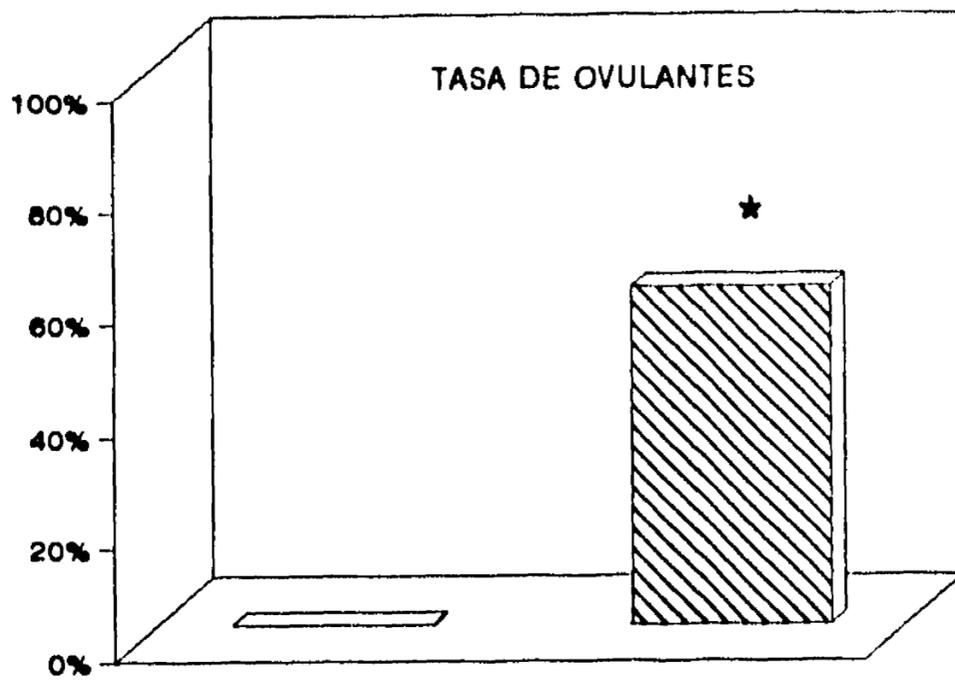
## **RESULTADOS**

### 1. Tasa de animales ovulantes y número de ovocitos

El reemplazo hormonal con hCG provocó que el 60 % de los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé ovularan y el número de ovocitos liberados por animal ovulante fue igual al del grupo con operación simulada (Fig. 11).

### 2. Receptores a la LH.

En los ovarios de los animales testigo absoluto y con operación simulada sacrificados al primer estro vaginal, se observaron receptores a LH en los folículos en desarrollo y en los cuerpos lúteos recién formados (Fig. 12a). En cambio, en los animales con lesión del rafé, sacrificados en el día del primer estro vaginal, se observaron folículos preovulatorios. En estos folículos la distribución de los receptores a la LH fue similar a la que se presenta en un animal en la tarde del proestro y se identificaron en las células de la teca y de la granulosa, sin embargo, su densidad es menor (Fig. 12b).



\*p<0.05 vs LNDR

Fig. 11. Respuesta ovulatoria (tasa de animales ovulantes y número de ovocitos liberados por ratas con lesión del núcleo dorsal del rafé en el día 30 y estimuladas con 10 u.i. de hCG.

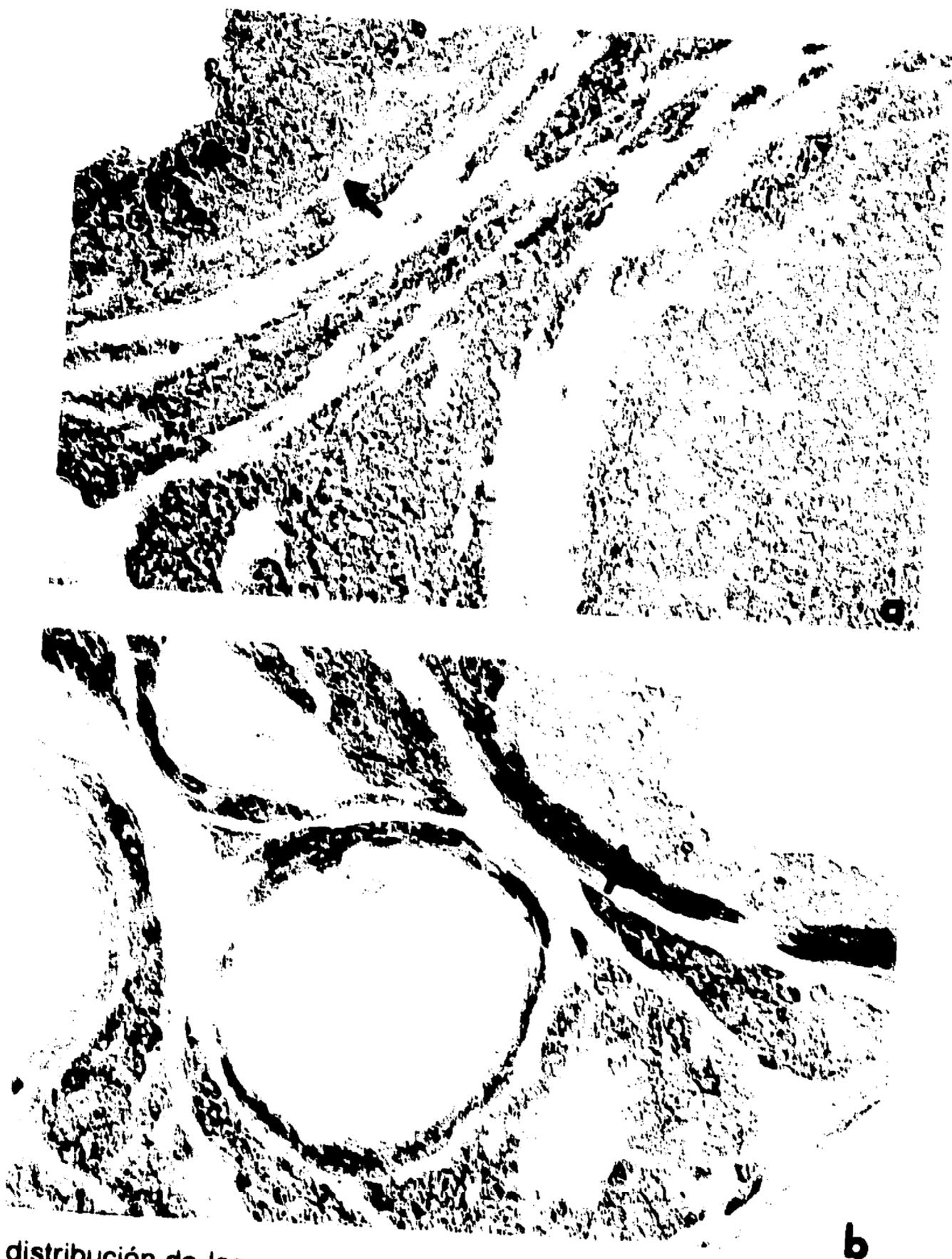


Fig. 12. distribución de los receptores a la LH. a) corte de ovario de un animal con operación simulada donde se observa la presencia de los receptores a la LH en folículos medianos y en el cuerpo lúteo; b) corte de ovario de un animal con lesión del rafé dorsal donde se muestra la presencia de los receptores a la LH en la pared del folículo preovulatorio. La flecha sombreada indica receptores a la LH (RLH+).

Los resultados de estos estudios permiten sugerir que el bloqueo de la ovulación observado en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafe en el día 30, pudo deberse a una alteración en la secreción preovulatoria de la LH que precede la primera ovulación, ya que el tratamiento con hCG restauró la ovulación en los animales con lesión. Otra explicación es que se haya modificado la respuesta del ovario a dicha hormona, debido a que en los ovarios de estos animales los receptores a la LH estuvieron presentes, pero posiblemente su expresión se modificó.

Sin embargo, con estos resultados no es posible concluir si los efectos diferenciales observados en la ovulación en los animales con lesión en la fase media y final de la etapa juvenil, son debidos a modificaciones en la actividad de la neurona serotoninérgica, dopaminérgica y noradrenérgica del hipotálamo, desde el momento de la lesión hasta el día del primer estro vaginal, o del crecimiento y la maduración folicular en los ovarios de estos animales. Por ello, se decidió efectuar un análisis temporal de los cambios en el sistema serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico del hipotálamo y del crecimiento y maduración folicular en los animales que presentaron modificaciones en la ovulación.

#### **4.- Estudio temporal de los cambios producidos en el sistema serotoninérgico del hipotálamo de ratas prepúberes, por la lesión del núcleo dorsal del rafe.**

Para analizar si los cambios en la ovulación observados en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafe en animales de 24, 27 ó 30 días de edad, se pueden explicar por modificaciones en la concentración de serotonina, catecolaminas y de la actividad de las neuronas serotoninérgica y catecolaminérgica, desde el momento de la lesión hasta el día del primer estro vaginal o por cambios en el crecimiento folicular de los ovarios de estos animales, se realizaron los siguientes experimentos.

Ratas hembras de 24, 27 ó 30 días de edad (fase juvenil) se les realizó la lesión del núcleo dorsal del raquídeo como y grupos de animales fueron sacrificadas cada 48 horas a partir de que se hizo la lesión, hasta el día del primer estro vaginal. En el hipotálamo de estos animales se cuantificó la concentración de serotonina, catecolaminas y sus metabolitos. En los ovarios de los animales lesionados el día 27 y 30 se realizó el estudio de la población folicular. Como grupos de comparación se utilizaron animales intactos o con operación simulada sacrificados a las mismas edades que los animales con lesión.

Como grupo testigo de comparación de los ocho días posteriores a las intervenciones, se emplearon los animales sin tratamiento sacrificados el día del primer estro vaginal, debido a que el primer estro vaginal se presentó a los  $37.5 \pm 0.4$  días.

## **RESULTADOS**

### **Animal de 30 días**

#### 1. Concentración de serotonina y catecolaminas.

En la fig. 13 se muestran los resultados de la concentración de serotonina (a), 5-HIAA (b) y de la actividad de la neurona serotoninérgica (c) en el hipotálamo de las ratas hembras con operación simulada o lesión del núcleo dorsal del raquídeo, sacrificadas cada 48 horas a partir de la lesión. En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales sometidos a operación simulada, la concentración de serotonina aumentó a las 48 horas de producida la intervención y se normalizó posteriormente. En el día del primer estro vaginal, la concentración del 5-HIAA aumentó significativamente en el hipotálamo de los animales con operación simulada, mientras que en comparación con el grupo testigo absoluto, la actividad de la neurona serotoninérgica no se modificó. En los animales con lesión del

núcleo dorsal del rafe, la concentración de serotonina y del 5-HIAA disminuyó en todos los momentos estudiados (Fig. 13 a y b). Mientras que, la actividad de la neurona serotoninérgica aumentó en los animales sacrificados 48 horas después de la intervención y en el día del primer estro vaginal (Fig. 13c).

En comparación con los animales sin tratamiento, las concentraciones de DA y DOPAC y la actividad de la neurona dopaminérgica, fueron modificadas de manera paralela por la operación simulada y la lesión del núcleo dorsal del rafe (Tabla X).

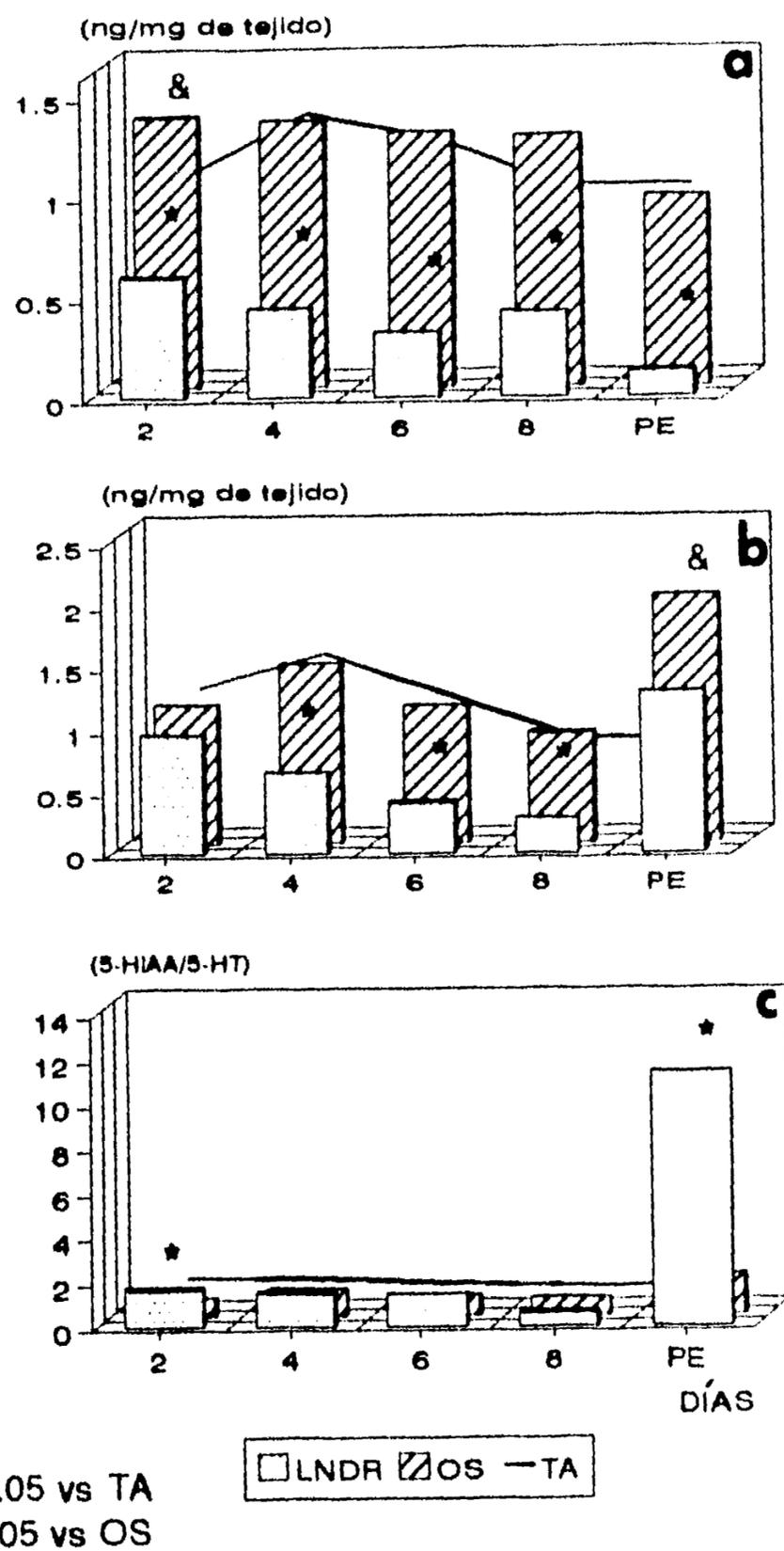


Fig. 13. Media de la concentración (ng/mg de tejido) de: a) serotonina (5-HT), b) del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y c) la actividad de la neurona serotoninérgica (5-HIAA/5-HT) en el hipotálamo de ratas hembras testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del raqué al día 30, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.

**Tabla X. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de la dopamina (DA), del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y de la actividad de la neurona dopaminérgica en el hipotálamo de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) en el día 30, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

<b>GRUPO</b>	<b>DA</b>	<b>DOPAC</b>	<b>ACTIVIDAD DE LA NEURONA</b>
<b>2 DÍAS</b>			
TA	0.26 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.09
OS	0.19 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.18 &	13.39 $\pm$ 6.24 &
LNDR	0.21 $\pm$ 0.08	0.86 $\pm$ 0.08	11.43 $\pm$ 1.18
<b>4 DÍAS</b>			
TA	0.33 $\pm$ 0.08	0.11 $\pm$ 0.01	0.42 $\pm$ 0.11
OS	0.50 $\pm$ 0.04	0.21 $\pm$ 0.03	0.44 $\pm$ 0.09
LNDR	0.52 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.005	0.36 $\pm$ 0.02
<b>6 DÍAS</b>			
TA	0.13 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02	1.31 $\pm$ 0.23
OS	0.33 $\pm$ 0.02 &	0.13 $\pm$ 0.02	0.40 $\pm$ 0.05 &
LNDR	0.34 $\pm$ 0.04	0.13 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.11
<b>8 DÍAS</b>			
TA	0.07 $\pm$ 0.005	0.81 $\pm$ 0.04	11.39 $\pm$ 0.69
OS	0.50 $\pm$ 0.09 &	0.12 $\pm$ 0.008 &	0.37 $\pm$ 0.12 &
LNDR	0.68 $\pm$ 0.03	0.14 $\pm$ 0.02	0.21 $\pm$ 0.02
<b>PE</b>			
TA	0.07 $\pm$ 0.005	0.81 $\pm$ 0.04	11.39 $\pm$ 0.69
OS	0.22 $\pm$ 0.009	0.17 $\pm$ 0.09 &	0.78 $\pm$ 0.47 &
LNDR	0.19 $\pm$ 0.12	0.24 $\pm$ 0.03	2.41 $\pm$ 0.78

& p<0.05 vs. grupo con TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, en el hipotálamo de los animales con operación simulada o lesión del núcleo dorsal del rafé, no se observaron diferencias significativas en las concentraciones de NA y MHPG, aunque la actividad de la neurona noradrenérgica aumentó significativamente en los animales con lesión, sacrificados 96 horas después de la misma (Tabla XI).

**Tabla XI. Mediate.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y de la actividad de la neurona noradrenérgica en el hipotálamo de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) en el día 30, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

<b>GRUPO</b>	<b>NA</b>	<b>MHPG</b>	<b>ACTIVIDAD DE LA NEURONA</b>
<b>2 DÍAS</b>			
TA	2.70±0.16	0.28± 0.03	0.10±0.006
OS	3.56±0.32	0.22± 0.05	0.06± 0.01
LNDR	3.15±0.18	0.21± 0.06	0.07± 0.02
<b>4 DÍAS</b>			
TA	2.55±0.25	0.38± 0.19	0.07±0.006
OS	2.78±0.10	0.17± 0.01	0.06±0.004
LNDR	2.60±0.13	0.17± 0.03	0.40±0.004 *
<b>6 DÍAS</b>			
TA	2.69±0.07	0.18±0.005	0.21±0.14
OS	2.54±0.18	0.15± 0.01	0.06±0.005
LNDR	1.56±0.11 *	0.17±0.004	0.11± 0.01
<b>8 DÍAS</b>			
TA	3.74±0.31	0.21± 0.07	0.06±0.005
OS	2.54±0.17	0.15±0.008	0.06±0.004
LNDR	3.12±0.21	0.20± 0.03	0.06±0.012
<b>PE</b>			
TA	3.74±0.31	0.21± 0.07	0.06±0.005
OS	3.15±0.49	0.45± 0.25	0.15±0.04 &
LNDR	3.96±0.17	0.49± 0.14	0.12±0.04

& p<0.05 vs. grupo con TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

\* p<0.05 vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

## 2. Peso corporal y de órganos.

El aumento ponderal de los animales, el peso de los ovarios y el útero no fueron modificados por la operación simulada. En cambio, el peso corporal y del útero de los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé, disminuyó significativamente a las 48 horas después de la intervención y este parámetro se recuperó en los animales autopsiados en los días subsiguientes, aun cuando los animales presentaron su primer estro vaginal, el peso corporal y del útero fue menor que el de los animales testigo. Mientras que el peso de los ovarios de los

animales lesionados fue similar al del grupo con operación simulada durante las primeras 192 horas, pero en el día del primer estro vaginal el peso de la gónada fue menor que el de los animales testigo (Tabla XII)

**Tabla XIII. Peso corporal (g) de los ovarios y del útero (mg) (media  $\pm$  e.e.m.) de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) en el día 30, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

GRUPO	n	PESO CORPORAL	OVARIOS	ÚTERO
<b>2 DÍAS</b>				
TA	10	75.0 $\pm$ 1.78	27.5 $\pm$ 0.8	64.8 $\pm$ 1.8
OS	9	80.3 $\pm$ 2.45	24.6 $\pm$ 1.5	76.4 $\pm$ 6.6
LNDR	10	72.7 $\pm$ 1.9 *	24.0 $\pm$ 1.3	52.0 $\pm$ 2.7 *
<b>4 DÍAS</b>				
TA	5	91.6 $\pm$ 4.1	26.6 $\pm$ 1.9	104.4 $\pm$ 5.9
OS	6	81.3 $\pm$ 3.6	24.5 $\pm$ 0.6	90.1 $\pm$ 11.8
LNDR	5	74.4 $\pm$ 4.0	25.6 $\pm$ 1.2	65.1 $\pm$ 3.9
<b>6 DÍAS</b>				
TA	6	100.5 $\pm$ 3.3	23.9 $\pm$ 0.8	94.8 $\pm$ 3.8
OS	5	91.6 $\pm$ 3.9	25.5 $\pm$ 1.3	78.6 $\pm$ 5.9
LNDR	5	86.8 $\pm$ 3.4	24.3 $\pm$ 1.5	72.8 $\pm$ 6.0
<b>8 DÍAS</b>				
TA	24	107.3 $\pm$ 1.5	36.1 $\pm$ 1.4	169.4 $\pm$ 5.7
OS	10	97.4 $\pm$ 2.6	29.1 $\pm$ 1.1	88.9 $\pm$ 3.2 *
LNDR	6	100.8 $\pm$ 3.6	24.0 $\pm$ 1.8	75.0 $\pm$ 6.1
<b>PE</b>				
TA	24	107.3 $\pm$ 1.5	36.1 $\pm$ 1.4	169.4 $\pm$ 5.7
OS	16	113.7 $\pm$ 3.9	29.6 $\pm$ 1.8	146.6 $\pm$ 7.3
LNDR	14	100.6 $\pm$ 3.2 *	21.8 $\pm$ 1.4 *	117.2 $\pm$ 10.2 *

\*  $p < 0.05$  vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

### 3. Población folicular.

En los ovarios de los animales con operación simulada no se modificó el número de folículos totales medidos y su distribución por rango, con excepción del número de folículos preovulatorios que aumentaron a las 192 horas de la operación. En cambio, en las ratas con lesión del núcleo dorsal del rafé, el número de folículos totales, pequeños y medianos disminuyó significativamente a las 96 ó 144 horas después de producida la lesión, mientras que a las 192 horas (8 días), se observó el aumento en el número de folículos pequeños y medianos lo que puede interpretarse como la aceleración del crecimiento folicular. En el día del primer estro vaginal, el número de folículos preovulatorios presentes fue el doble que en el grupo con operación falsa (Tabla XIII).

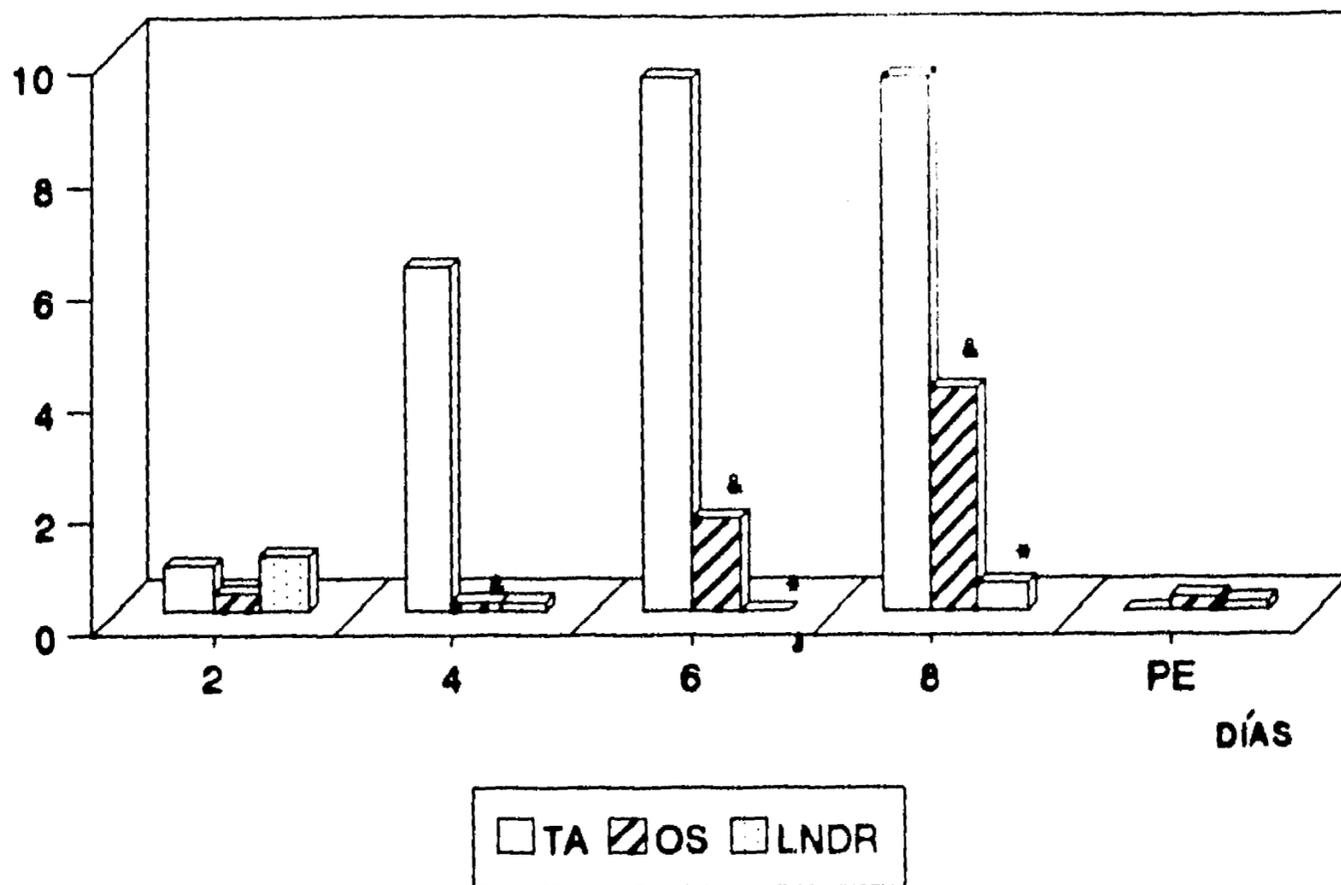
El número de folículos sanos en los ovarios de los animales con operación simulada disminuyó entre las 96 y 196 horas posteriores a la intervención. Esta disminución fue más evidente en el grupo con lesión del rafé y a las 48 horas previas a la primera ovulación. En los ovarios de estos animales el número de folículos sanos es muy bajo y al primer estro vaginal todos los folículos preovulatorios cuantificados presentaron signos evidentes de atresia (Fig. 14).

**Tabla XIII. Número de folículos (media  $\pm$  e.e.m.) medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del raquí (LNDR) en el día 30 y sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

GRUPO	FOLÍCULOS TOTALES	DISTRIBUCIÓN POR RANGO		
		< 390 $\mu$ m	39-500 $\mu$ m	>500 $\mu$ m
<b>2 DÍAS</b>				
TA	189.0 $\pm$ 41.7	168.8 $\pm$ 45.8	11.7 $\pm$ 1.6	1.3 $\pm$ 0.4
OS	94.2 $\pm$ 9.2	84.9 $\pm$ 9.4	7.2 $\pm$ 1.1	2.5 $\pm$ 0.6
LNDR	144.8 $\pm$ 27.9	131.6 $\pm$ 27.8	9.3 $\pm$ 1.1	4.3 $\pm$ 0.6
<b>4 DÍAS</b>				
TA	139.2 $\pm$ 13.4	121.8 $\pm$ 11.5	9.8 $\pm$ 1.9	7.5 $\pm$ 1.0
OS	161.0 $\pm$ 8.8	147.0 $\pm$ 8.6	10.8 $\pm$ 1.8	3.8 $\pm$ 1.4
LNDR	137.2 $\pm$ 3.5 *	120.3 $\pm$ 3.5 *	11.5 $\pm$ 1.2	5.3 $\pm$ 1.1
<b>6 DÍAS</b>				
TA	136.0 $\pm$ 13.6	117.2 $\pm$ 13.9	8.7 $\pm$ 2.11	10.7 $\pm$ 2.1
OS	141.3 $\pm$ 3.7	117.7 $\pm$ 0.9	19.0 $\pm$ 4.7	4.7 $\pm$ 0.8
LNDR	114.7 $\pm$ 3.8 *	103.5 $\pm$ 2.0 *	9.2 $\pm$ 2.3	2.0 $\pm$ 0.6 *
<b>8 DÍAS</b>				
TA	95.8 $\pm$ 12.2	82.0 $\pm$ 11.0	13.4 $\pm$ 1.9	1.0 $\pm$ 0.4
OS	87.5 $\pm$ 3.0	73.8 $\pm$ 4.1	7.2 $\pm$ 1.1	9.5 $\pm$ 0.8 &
LNDR	124.0 $\pm$ 7.0 *	98.8 $\pm$ 4.8 *	16.8 $\pm$ 2.3 *	8.3 $\pm$ 1.5
<b>PE</b>				
TA	95.8 $\pm$ 12.2	82.0 $\pm$ 11.0	13.0 $\pm$ 1.9	1.0 $\pm$ 0.4
OS	86.8 $\pm$ 4.5	73.1 $\pm$ 4.1	11.7 $\pm$ 1.5	2.0 $\pm$ 0.4
LNDR	109.2 $\pm$ 9.8	94.7 $\pm$ 7.1	9.0 $\pm$ 2.8	5.5 $\pm$ 0.8 *

& p<0.05 vs. grupo con TA (Prueba de Kruskal-Wallis).

\* p<0.05 vs. grupo con OS (Prueba de Kruskal-Wallis).



&  $p < 0.05$  vs TA  
 \*  $P < 0.05$  vs OS

Fig. 14. Media del número de folículos preovulatorios sanos con diámetro  $>500 \mu\text{m}$  medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) en el día 30 y sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.

### Animal de 27 días

#### 1. Concentración de serotonina y catecolaminas.

En comparación con los grupos de animales testigo absoluto, en el hipotálamo de las ratas con operación simulada se observó un incremento en la concentración de serotonina 48 y 240 horas después de la intervención. En cambio, en los grupos con lesión del rafé, el contenido de la amina disminuyó en

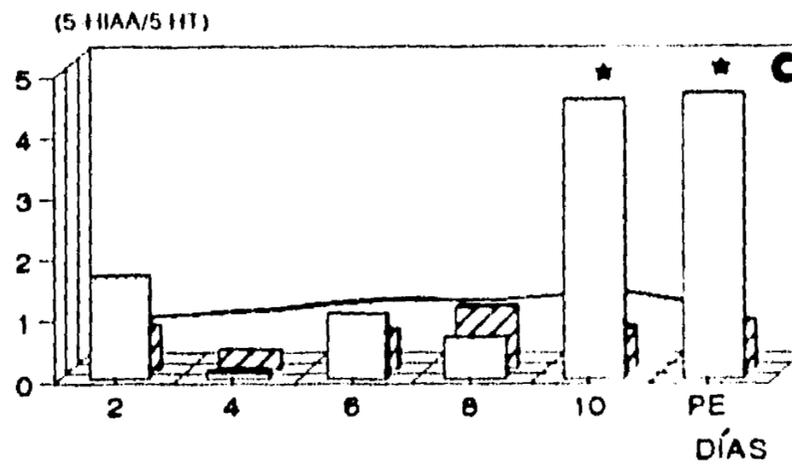
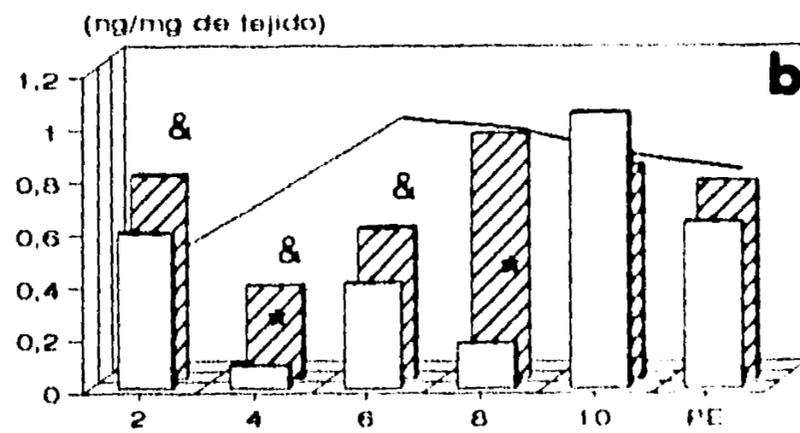
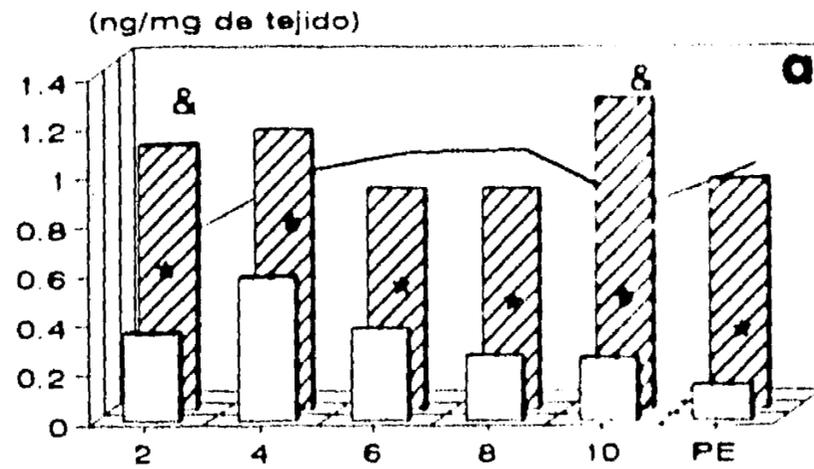
1

todos los grupos, pero esta disminución fue más evidente a las 240 horas y al primer estro vaginal (Fig 15a).

En el hipotálamo de los animales con operación simulada la concentración del 5-HIAA se incrementó significativamente a las 48 horas de la intervención, mientras que disminuyó a las 96 y 144 horas posteriores (Fig. 15b). Las modificaciones en las concentraciones de 5-HT y su metabolito (Figs. 15a y b) se reflejan claramente al analizar la actividad de la neurona serotoninérgica (Fig. 15c) donde se observó un aumento significativo a las 240 horas (10 días) de realizada la intervención y en el día del primer estro vaginal.

El análisis de los cambios en la concentración de DA en el hipotálamo se muestra en la tabla XIV. En el grupo con operación simulada la concentración de DA disminuyó a las 48 horas de realizada la intervención, mientras que a las 240 horas y al primer estro vaginal se incrementó significativamente. En cambio, la concentración de DOPAC disminuyó a las 144 horas y al primer estro vaginal, siendo en este día más evidente la disminución del metabolito.

En el grupo con lesión del rafé, a las 48 y 144 horas de la intervención la concentración de DA se incrementó y en el día del primer estro vaginal disminuyó. La actividad de la neurona dopaminérgica en los animales testigo absoluto fue significativamente mayor en el día del primer estro vaginal en comparación a los días previos. Este evento se modificó de manera paralela por la operación simulada y la lesión del núcleo dorsal del rafé en el día del primer estro (Tabla XIV).



& p < 0.05 vs TA  
 \* p < 0.05 vs OS

□ LNDR    ▨ OS    — TA

Fig. 15. Media de la concentración (ng/mg de tejido) de: a) serotonina (5-HT), b) del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y c) la actividad de la neurona serotoninérgica (5-HIAA/5-HT) en el hipotálamo de ratas hembras testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé al día 27, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.

**Tabla XIV. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de dopamina (DA), del ácido 3,4-dihidroxifenilacético (DOPAC) y de la actividad de la neurona dopaminérgica en el hipotálamo de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del raquí (LNDR) en el día 27, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

<b>GRUPO</b>	<b>DA</b>	<b>DOPAC</b>	<b>ACTIVIDAD DE LA NEURONA</b>
<b>2 DÍAS</b>			
TA	0.41 $\pm$ 0.04	0.25 $\pm$ 0.04	0.64 $\pm$ 0.06
OS	0.25 $\pm$ 0.01 &	0.18 $\pm$ 0.02	0.76 $\pm$ 0.11
LNDR	0.51 $\pm$ 0.04 *	0.29 $\pm$ 0.01 *	0.58 $\pm$ 0.05
<b>4 DÍAS</b>			
TA	0.19 $\pm$ 0.01	0.18 $\pm$ 0.03	0.95 $\pm$ 0.15
OS	0.13 $\pm$ 0.02	0.12 $\pm$ 0.007	0.94 $\pm$ 0.12
LNDR	0.06 $\pm$ 0.006 *	0.12 $\pm$ 0.008	2.20 $\pm$ 0.26 *
<b>6 DÍAS</b>			
TA	0.20 $\pm$ 0.01	0.41 $\pm$ 0.08	2.32 $\pm$ 0.56
OS	0.11 $\pm$ 0.02	0.13 $\pm$ 0.01 &	1.30 $\pm$ 0.25
LNDR	0.20 $\pm$ 0.02 *	0.13 $\pm$ 0.008	0.69 $\pm$ 0.12
<b>8 DÍAS</b>			
TA	0.49 $\pm$ 0.13	0.14 $\pm$ 0.02	0.41 $\pm$ 0.11
OS	0.35 $\pm$ 0.07	0.12 $\pm$ 0.006	0.52 $\pm$ 0.13
LNDR	0.39 $\pm$ 0.03	0.10 $\pm$ 0.003	0.27 $\pm$ 0.02
<b>10 DÍAS</b>			
TA	0.19 $\pm$ 0.005	0.09 $\pm$ 0.005	0.47 $\pm$ 0.03
OS	0.43 $\pm$ 0.06 &	0.20 $\pm$ 0.09	0.30 $\pm$ 0.06
LNDR	0.44 $\pm$ 0.06	0.22 $\pm$ 0.05	0.57 $\pm$ 0.18
<b>PE</b>			
TA	0.07 $\pm$ 0.05	0.81 $\pm$ 0.04	12.20 $\pm$ 0.99
OS	0.98 $\pm$ 0.02 &	0.09 $\pm$ 0.001 &	0.09 $\pm$ 0.002 &
LNDR	0.51 $\pm$ 0.04 *	0.10 $\pm$ 0.006	0.19 $\pm$ 0.12

&  $p < 0.05$  vs. grupo con TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

\*  $p$  vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

En el hipotálamo de los animales con operación simulada la concentración de noradrenalina disminuyó en el día del primer estro vaginal, mientras que la concentración de su metabolito, el MHPG, no presentó cambios después de la intervención. En cambio, en los animales con lesión la concentración de NA disminuyó a las 48 horas y el MHPG en el estro vaginal (Tabla XV).

En comparación con el grupo con operación simulada, en los animales con lesión se incrementó la actividad de la neurona noradrenérgica a los 4 días, mientras que al primer estro vaginal ésta disminuyó significativamente

**Tabla XV. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del hipotálamo (mg) y de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), 4-hidroxi-3-metoxifeniletilenglicol (MHPG) y de la actividad de la neurona noradrenérgica de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) en el día 27, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

GRUPO	NA	MHPG	ACTIVIDAD DE LA NEURONA
<b>2 DÍAS</b>			
TA	0.97 $\pm$ 0.05	ND	-
OS	0.98 $\pm$ 0.02	ND	-
LNDR	1.11 $\pm$ 0.06	ND	-
<b>4 DÍAS</b>			
TA	1.22 $\pm$ 0.06	0.18 $\pm$ 0.005	0.15 $\pm$ 0.007
OS	1.30 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.005	0.13 $\pm$ 0.007
LNDR	0.84 $\pm$ 0.001 *	0.20 $\pm$ 0.007	0.24 $\pm$ 0.02 *
<b>6 DÍAS</b>			
TA	2.62 $\pm$ 0.12	0.13 $\pm$ 0.01	0.05 $\pm$ 0.007
OS	2.33 $\pm$ 0.21	0.14 $\pm$ 0.03	0.06 $\pm$ 0.01
LNDR	2.43 $\pm$ 0.16	0.21 $\pm$ 0.007	0.09 $\pm$ 0.008
<b>8 DÍAS</b>			
TA	2.81 $\pm$ 0.24	0.18 $\pm$ 0.006	0.07 $\pm$ 0.005
OS	2.60 $\pm$ 0.12	0.17 $\pm$ 0.007	0.07 $\pm$ 0.005
LNDR	1.91 $\pm$ 0.27	0.15 $\pm$ 0.008	0.09 $\pm$ 0.02
<b>10 DÍAS</b>			
TA	2.22 $\pm$ 0.52	0.14 $\pm$ 0.07	0.06 $\pm$ 0.004
OS	2.63 $\pm$ 0.30	0.13 $\pm$ 0.009	0.05 $\pm$ 0.008
LNDR	2.64 $\pm$ 0.20	0.13 $\pm$ 0.004	0.05 $\pm$ 0.008
<b>PE</b>			
TA	3.74 $\pm$ 0.31	0.21 $\pm$ 0.07	0.11 $\pm$ 0.05
OS	2.61 $\pm$ 0.18 &	0.20 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.005
LNDR	3.13 $\pm$ 0.24	0.08 $\pm$ 0.04 *	0.02 $\pm$ 0.01

& p<0.05 vs. grupo con TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

\* p<0.05 vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

## 2. Peso corporal y de órganos.

Los resultados del peso corporal, de los ovarios y del útero se presentan en la tabla XVI. El peso corporal de los animales con operación simulada o con lesión del rafé, disminuyó significativamente a las 48 horas de la intervención y se recuperó en los días subsiguientes. No se observaron cambios en el peso de los ovarios, mientras que el peso del útero disminuyó tanto en los animales con lesión como en los que se practicó la operación simulada excepto a las 240 horas (10 días), momento en el que el peso del útero de los animales con lesión fue significativamente mayor que el de los animales testigo absoluto, mientras que, el de los animales con lesión falsa fue significativamente menor. No se observaron diferencias en el peso del útero, en los tres grupos de animales sacrificados en el día del primer estro vaginal.

## 3. Población folicular

El número de folículos totales medidos y su distribución por rangos, fue similar en los animales con lesión falsa y los testigos absolutos, con excepción de las 96 horas después de la operación donde se observó la disminución del número de folículos totales, pequeños y medianos. En los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé sacrificadas 48 ó 240 horas después de producida la lesión disminuyó el número folículos medianos. En los otros periodos estudiados no se observaron cambios (tabla XVII).

**Tabla XVI. Peso corporal (g) de los ovarios y del útero (mg) (media  $\pm$  e.e.m.) de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del raquí (LNDR) en el día 27, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

GRUPO	n	PESO CORPORAL	OVARIOS	ÚTERO
<b>2 DÍAS</b>				
TA	11	68.7 $\pm$ 0.9	23.8 $\pm$ 1.6	57.7 $\pm$ 2.4
OS	11	60.2 $\pm$ 1.6 &	21.6 $\pm$ 0.8	44.9 $\pm$ 2.9 &
LNDR	11	54.0 $\pm$ 1.4 *	22.9 $\pm$ 0.8	48.8 $\pm$ 1.8
<b>4 DÍAS</b>				
TA	10	71.4 $\pm$ 1.4	21.8 $\pm$ 0.7	54.3 $\pm$ 2.6
OS	9	72.9 $\pm$ 3.4	24.9 $\pm$ 1.3	57.1 $\pm$ 1.8
LNDR	10	64.7 $\pm$ 3.2	23.8 $\pm$ 1.1	49.4 $\pm$ 1.7 *
<b>6 DÍAS</b>				
TA	9	91.2 $\pm$ 2.5	27.6 $\pm$ 0.5	92.9 $\pm$ 3.0
OS	5	85.2 $\pm$ 2.4	28.5 $\pm$ 1.9	58.8 $\pm$ 1.8 &
LNDR	5	76.6 $\pm$ 4.5	23.2 $\pm$ 0.8	52.9 $\pm$ 7.6
<b>8 DÍAS</b>				
TA	6	91.5 $\pm$ 5.4	28.6 $\pm$ 0.5	81.6 $\pm$ 6.9
OS	8	89.3 $\pm$ 4.0	28.4 $\pm$ 1.2	82.2 $\pm$ 4.9
LNDR	8	79.3 $\pm$ 2.6	25.2 $\pm$ 1.1	57.8 $\pm$ 3.5 *
<b>10 DÍAS</b>				
TA	5	99.6 $\pm$ 1.9	26.4 $\pm$ 0.6	80.8 $\pm$ 2.3
OS	8	93.4 $\pm$ 2.5	24.6 $\pm$ 1.4	59.9 $\pm$ 4.5 &
LNDR	6	94.7 $\pm$ 2.9	27.4 $\pm$ 1.1	150.1 $\pm$ 11.3 *
<b>PE</b>				
TA	24	107.3 $\pm$ 1.5	36.1 $\pm$ 1.4	169.3 $\pm$ 5.7
OS	13	111.7 $\pm$ 3.6	32.2 $\pm$ 1.5	152.1 $\pm$ 7.6
LNDR	10	113.7 $\pm$ 1.2	35.4 $\pm$ 2.8	149.4 $\pm$ 7.4

& p<0.05 vs. grupo con TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

\* p<0.05 vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey)

**Tabla XVII. Número de folículos (media  $\pm$  e.e.m.) en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del raquí (LNDR) en el día 27 y sacrificadas a diferentes periodos del desarrollo prepuberal.**

GRUPO	FOLÍCULOS TOTALES	DISTRIBUCION POR RANGO		
		< 390 $\mu$ m	390-500 $\mu$ m	>500 $\mu$ m
<b>2 DÍAS</b>				
TA	146.0 $\pm$ 6.7	127.7 $\pm$ 6.6	18.3 $\pm$ 2.3	0.0
OS	152.5 $\pm$ 10.7	146.4 $\pm$ 10.9	6.2 $\pm$ 0.9 &	0.0
LNDR	194.3 $\pm$ 16.1	183.0 $\pm$ 16.3	11.3 $\pm$ 1.4 *	0.0
<b>4 DÍAS</b>				
TA	162.8 $\pm$ 22.8	150.2 $\pm$ 24.1	11.3 $\pm$ 1.94	1.3 $\pm$ 0.5
OS	91.8 $\pm$ 15.5 &	89.3 $\pm$ 14.3 &	2.3 $\pm$ 0.8 &	0.2 $\pm$ 0.2
LNDR	125.7 $\pm$ 11.2	119.2 $\pm$ 11.2	4.8 $\pm$ 0.3	0.0
<b>6 DÍAS</b>				
TA	102.7 $\pm$ 11.1	94.7 $\pm$ 11.1	5.2 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.3
OS	127.8 $\pm$ 12.6	118.3 $\pm$ 12.4	6.5 $\pm$ 0.8	3.0 $\pm$ 0.5
LNDR	120.3 $\pm$ 7.8	112.8 $\pm$ 7.6	4.8 $\pm$ 1.8	2.7 $\pm$ 0.3
<b>10 DÍAS</b>				
TA	77.4 $\pm$ 5.2	56.8 $\pm$ 5.2	10.4 $\pm$ 1.2	8.4 $\pm$ 0.8
OS	87.3 $\pm$ 2.7	69.6 $\pm$ 1.8	9.7 $\pm$ 1.4	7.8 $\pm$ 0.6
LNDR	81.5 $\pm$ 6.3	52.6 $\pm$ 5.8	19.3 $\pm$ 1.3 *	8.5 $\pm$ 0.6
<b>PE</b>				
TA	95.8 $\pm$ 12.2	82.0 $\pm$ 11.0	13.0 $\pm$ 1.9	1.0 $\pm$ 0.4
OS	96.0 $\pm$ 5.2	81.5 $\pm$ 5.5	12.0 $\pm$ 1.6	2.5 $\pm$ 0.4
LNDR	91.7 $\pm$ 11.7	68.8 $\pm$ 9.7	9.0 $\pm$ 2.5	3.8 $\pm$ 0.8

& p<0.05 vs. grupo con TA (Prueba de Kruskal-Wallis)

\* p<0.05 vs. grupo con OS (Prueba de Kruskal-Wallis)

En los días previos a la apertura vaginal y en el día del primer estro vaginal, el número de folículos preovulatorios presentes fue similar en relación al grupo con operación simulada (Fig. 16). El número de folículos sanos fue mayor en los ovarios de los animales a las 240 horas de haber realizado la lesión, en los que se observó el incremento en el peso del útero.

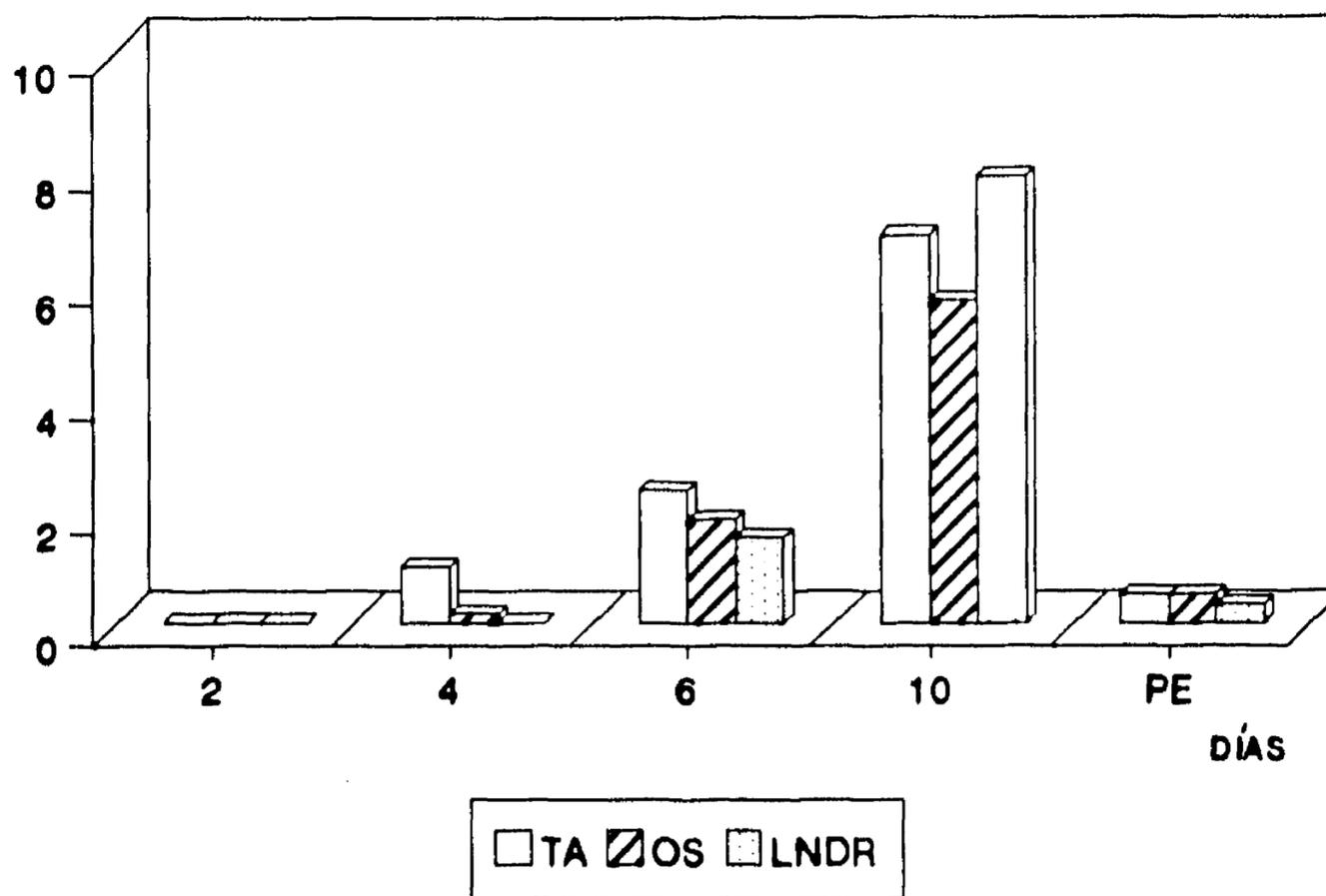


Fig. 16. Media del número de folículos preovulatorios sanos con diámetro < 500  $\mu\text{m}$  en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) al día 27, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.

### Animal de 24 días

#### 1. Concentración de serotonina y catecolaminas.

En la figura 17 (a, b y c) se muestra la concentración de serotonina, de su metabolito y de la actividad de la neurona en el hipotálamo de animales con operación simulada o con lesión del rafé realizada en el día 24 de vida y sacrificados a diferentes tiempos luego de la intervención. En los animales con

operación simulada la concentración de la amina disminuyó entre las 192 y las 288 horas posteriores a la intervención. En cambio, en todos los grupos con lesión del rafe la concentración de serotonina disminuyó en relación a sus respectivos grupos testigo con operación simulada. Tal disminución fue más evidente en los días cercanos la apertura vaginal.

En el hipotálamo de los animales con operación simulada la concentración del 5-HIAA fue mayor que en sus testigos absolutos a partir de las 144 horas posteriores a la intervención, con excepción de las 192 y 240 horas, donde se este evento se invirtió. En los grupos con lesión del rafe se observó la tendencia a la disminución de la concentración del 5-HIAA, la cual fue estadísticamente significativa entre las 96 y 384 horas posteriores a la lesión (Fig. 17b).

La actividad de la neurona serotoninérgica disminuyó a las 48 horas de la operación simulada, mientras que a las 288 y 336 horas este evento se invirtió. En cambio, cuando se realizó la lesión la actividad de la neurona aumenta, pero únicamente a las 48 y 144 horas de evolución y al primer estro vaginal en relación con sus respectivos grupos con operación simulada (Fig. 17c).

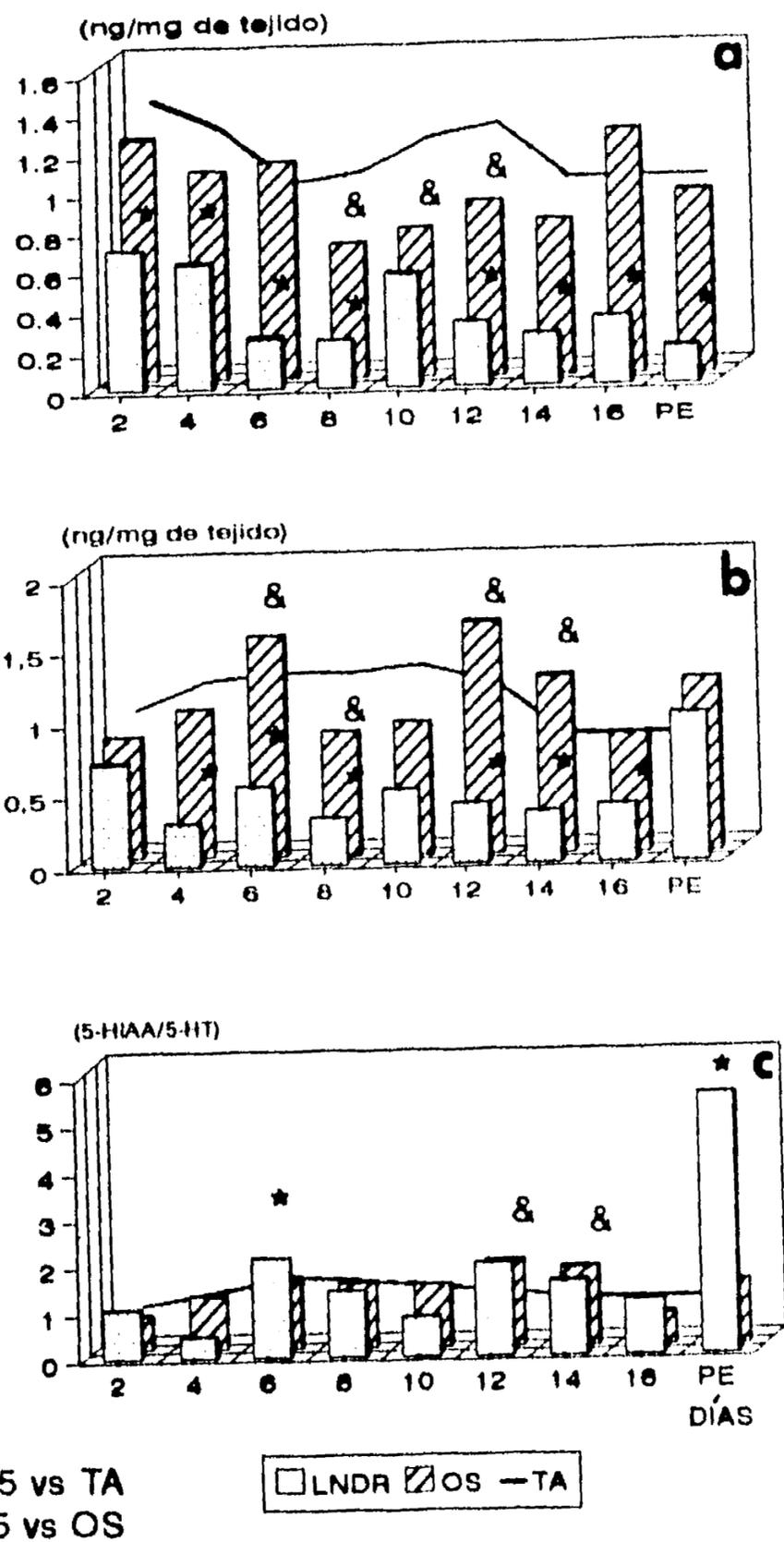


Fig.17. Media de la concentración (ng/mg de tejido) de: a) serotonina (5-HT), b) del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y c) de la actividad de la neurona serotoninérgica (5-HIAA/5-HT) en el hipotálamo de ratas hembras testigo absoluto (TA) o con operación simulada (OS) o lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) al día 24, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.

En el hipotálamo de los animales con operación simulada aumentó la concentración de DA a los catorce y dieciséis días posteriores a la intervención, mientras que, la concentración de su metabolito disminuyó de las 192 horas posteriores a intervención hasta el día del primer estro vaginal. La actividad de la neurona dopaminérgica disminuyó de las 336 horas posteriores a la intervención hasta el día del primer estro vaginal (Tabla XVIII).

Cuando se realizó la lesión del rafé, la concentración de la DA únicamente disminuyó en el día del primer estro vaginal y la de su metabolito y la actividad de la neurona dopaminérgica no se modificaron (Tabla XVIII).

La concentración de noradrenalina en el hipotálamo de los animales con operación simulada o lesión del núcleo dorsal del rafé no se modificó en ninguno de los periodos estudiados. Mientras que en el grupo con operación simulada, la concentración del MHPG se incrementó a las 144 y 288 horas posteriores a la intervención y en los animales con lesión este comportamiento se observó a las 48 horas. La actividad de la neurona noradrenérgica no se modificó por la operación simulada o por la lesión (Tabla XIX).

## 2. Peso corporal y de órganos.

En comparación con el grupo testigo absoluto el crecimiento ponderal de los animales únicamente disminuyó a los 48 horas de la operación simulada y el peso de los ovarios y del útero no se modificaron. Así mismo, en los animales con lesión del rafé no se observaron cambios en el peso de los animales y del útero. El tamaño de la gónada se mantuvo igual al grupo con operación simulada hasta las 124 horas posteriores a la intervención, pero a las 196 horas disminuyó y a los 16 días se incrementó, tales diferencias no se observaron más adelante (Tabla XX).

**Tabla XVIII. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de la dopamina, del ácido 3, 4-dihidroxifenilacético (DOPAC) o de la actividad de la neurona dopaminérgica en el hipotálamo de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) en el día 24, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

GRUPO	DA	DOPAC	ACTIVIDAD DE LA NEURONA
<b>2 DÍAS</b>			
TA	0.22 $\pm$ 0.01	0.13 $\pm$ 0.01	0.58 $\pm$ 0.04
OS	0.19 $\pm$ 0.33	0.15 $\pm$ 0.02	0.77 $\pm$ 0.09
LNDR	0.21 $\pm$ 0.04	0.14 $\pm$ 0.18	0.64 $\pm$ 0.04
<b>4 DÍAS</b>			
TA	0.42 $\pm$ 0.05	0.10 $\pm$ 0.02	0.23 $\pm$ 0.03
OS	0.43 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.05	0.21 $\pm$ 0.11
LNDR	0.36 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.07
<b>6 DÍAS</b>			
TA	0.19 $\pm$ 0.02	0.08 $\pm$ 0.004	0.42 $\pm$ 0.05
OS	0.24 $\pm$ 0.02	0.09 $\pm$ 0.02	0.37 $\pm$ 0.05
LNDR	0.47 $\pm$ 0.25	0.12 $\pm$ 0.01	0.47 $\pm$ 0.12
<b>8 DÍAS</b>			
TA	0.26 $\pm$ 0.06	0.15 $\pm$ 0.02	0.63 $\pm$ 0.1
OS	0.18 $\pm$ 0.008	0.06 $\pm$ 0.003 &	0.39 $\pm$ 0.06
LNDR	0.19 $\pm$ 0.009	0.06 $\pm$ 0.003	0.31 $\pm$ 0.02
<b>10 DÍAS</b>			
TA	0.29 $\pm$ 0.06	0.10 $\pm$ 0.01	0.46 $\pm$ 0.1
OS	0.23 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.006 &	0.31 $\pm$ 0.02
LNDR	0.19 $\pm$ 0.009	0.07 $\pm$ 0.04	0.36 $\pm$ 0.02
<b>12 DÍAS</b>			
TA	0.12 $\pm$ 0.04	0.28 $\pm$ 0.13	1.32 $\pm$ 0.23
OS	0.36 $\pm$ 0.11	0.18 $\pm$ 0.04	0.64 $\pm$ 0.14 &
LNDR	0.35 $\pm$ 0.04	0.05 $\pm$ 0.04	0.15 $\pm$ 0.13
<b>14 DÍAS</b>			
TA	0.07 $\pm$ 0.005	0.81 $\pm$ 0.04	12.20 $\pm$ 0.1.
OS	0.67 $\pm$ 0.07 &	0.14 $\pm$ 0.02 &	0.22 $\pm$ 0.04 &
LNDR	0.37 $\pm$ 0.06	0.11 $\pm$ 0.01	0.32 $\pm$ 0.05
<b>16 DÍAS</b>			
TA	0.07 $\pm$ 0.005	0.81 $\pm$ 0.04	12.20 $\pm$ 0.1
OS	0.35 $\pm$ 0.02 &	0.19 $\pm$ 0.02 &	0.59 $\pm$ 0.11 &
LNDR	0.33 $\pm$ 0.01	0.16 $\pm$ 0.02	0.48 $\pm$ 0.06
<b>PE</b>			
TA	0.07 $\pm$ 0.005	0.81 $\pm$ 0.04	12.20 $\pm$ 0.1
OS	0.29 $\pm$ 0.06 &	0.15 $\pm$ 0.09 &	1.40 $\pm$ 1.20 &
LNDR	0.08 $\pm$ 0.006*	0.20 $\pm$ 0.06	2.63 $\pm$ 0.98

& p<0.05 vs. grupo con TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

\* p<0.05 vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

**Tabla XIX. Media  $\pm$  e.e.m. del peso del hipotálamo (mg) y de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y de la actividad de la neurona noradrenérgica en el hipotálamo de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé (LNDR) en el día 24, sacrificadas después de la lesión.**

GRUPO	NA	MHPG	ACTIVIDAD DE LA NEURONA
<b>2 DÍAS</b>			
TA	2.63 $\pm$ 0.09	0.28 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.14
OS	2.97 $\pm$ 0.15	0.34 $\pm$ 0.01	0.11 $\pm$ 0.004
LNDR	2.82 $\pm$ 0.07	0.48 $\pm$ 0.04 *	0.17 $\pm$ 0.02
<b>4 DÍAS</b>			
TA	2.85 $\pm$ 0.18	0.45 $\pm$ 0.12	0.16 $\pm$ 0.04
OS	3.23 $\pm$ 0.02	0.62 $\pm$ 0.001	0.19 $\pm$ 0.001
LNDR	2.99 $\pm$ 0.05	0.63 $\pm$ 0.01	0.21 $\pm$ 0.002
<b>6 DÍAS</b>			
TA	2.85 $\pm$ 0.14	0.24 $\pm$ 0.008	0.08 $\pm$ 0.007
OS	3.07 $\pm$ 0.12	0.34 $\pm$ 0.02 &	0.11 $\pm$ 0.01
LNDR	3.33 $\pm$ 0.25	0.29 $\pm$ 0.03	0.09 $\pm$ 0.01
<b>8 DÍAS</b>			
TA	2.70 $\pm$ 0.16	0.28 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.16
OS	2.70 $\pm$ 0.06	0.24 $\pm$ 0.01	0.09 $\pm$ 0.01
LNDR	2.95 $\pm$ 0.05	0.30 $\pm$ 0.01	0.10 $\pm$ 0.007
<b>10 DÍAS</b>			
TA	2.69 $\pm$ 0.19	0.19 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.004
OS	3.29 $\pm$ 0.12	0.22 $\pm$ 0.02	0.07 $\pm$ 0.005
LNDR	3.55 $\pm$ 0.21	0.21 $\pm$ 0.02	0.06 $\pm$ 0.006
<b>12 DÍAS</b>			
TA	2.69 $\pm$ 0.07	0.19 $\pm$ 0.006	0.17 $\pm$ 0.11
OS	3.13 $\pm$ 0.15	0.64 $\pm$ 0.05 &	0.20 $\pm$ 0.01
LNDR	3.63 $\pm$ 0.25	0.63 $\pm$ 0.03	0.18 $\pm$ 0.02
<b>14 DÍAS</b>			
TA	3.74 $\pm$ 0.31	0.21 $\pm$ 0.07	0.06 $\pm$ 0.005
OS	3.99 $\pm$ 0.39	0.66 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.02
LNDR	3.11 $\pm$ 0.03	0.49 $\pm$ 0.06	0.16 $\pm$ 0.02
<b>16 DÍAS</b>			
TA	3.74 $\pm$ 0.31	0.21 $\pm$ 0.07	0.06 $\pm$ 0.005
OS	2.86 $\pm$ 0.37	0.55 $\pm$ 0.03	0.20 $\pm$ 0.02
LNDR	2.47 $\pm$ 0.15	0.60 $\pm$ 0.02	0.24 $\pm$ 0.01
<b>PE</b>			
TA	3.74 $\pm$ 0.31	0.21 $\pm$ 0.07	0.06 $\pm$ 0.005
OS	3.76 $\pm$ 0.48	0.29 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.02
LNDR	4.52 $\pm$ 0.15	0.20 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.008

& p<0.05 vs. grupo con TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

\* p<0.05 vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

**Tabla XX. Peso corporal (g) de los ovarios y del útero (mg) (media  $\pm$  e.e.m.) de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del raquídeo (LNDR) en el día 24, sacrificadas a diferentes tiempos después de realizada la lesión.**

GRUPO	n	PESO CORPORAL	OVARIOS	ÚTERO
<b>2 DÍAS</b>				
TA		75.6 $\pm$ 2.9	23.7 $\pm$ 2.1	57.8 $\pm$ 2.8
OS	5	71.6 $\pm$ 6.6	24.7 $\pm$ 0.7	53.2 $\pm$ 1.8
LNDR	5	65.2 $\pm$ 5.8	23.5 $\pm$ 1.8	47.1 $\pm$ 2.0
<b>4 DÍAS</b>				
TA	11	67.0 $\pm$ 1.6	24.3 $\pm$ 1.0	51.5 $\pm$ 2.7
OS	6	58.5 $\pm$ 3.6 &	24.4 $\pm$ 1.6	46.2 $\pm$ 2.5
LNDR	10	52.3 $\pm$ 1.8	22.9 $\pm$ 0.9	43.3 $\pm$ 1.8
<b>6 DÍAS</b>				
TA	5	75.6 $\pm$ 2.9	23.7 $\pm$ 2.1	57.8 $\pm$ 2.8
OS	5	71.6 $\pm$ 6.6	24.7 $\pm$ 0.7	53.2 $\pm$ 1.8
LNDR	5	65.2 $\pm$ 5.8	23.5 $\pm$ 1.8	47.1 $\pm$ 2.0
<b>8 DÍAS</b>				
TA	5	72.8 $\pm$ 2.7	27.2 $\pm$ 1.1	66.4 $\pm$ 2.6
OS	5	81.4 $\pm$ 5.4	28.2 $\pm$ 0.9	58.6 $\pm$ 3.0
LNDR	6	66.7 $\pm$ 5.0	22.7 $\pm$ 1.1*	53.3 $\pm$ 3.7
<b>10 DÍAS</b>				
TA	5	75.6 $\pm$ 2.9	23.7 $\pm$ 4.12	57.8 $\pm$ 2.85
OS	5	71.6 $\pm$ 6.6	24.7 $\pm$ 0.7	53.2 $\pm$ 1.8
LNDR	5	65.2 $\pm$ 5.8	23.5 $\pm$ 1.8	47.1 $\pm$ 2.0
<b>12 DÍAS</b>				
TA	6	100.5 $\pm$ 3.3	23.9 $\pm$ 0.8	94.8 $\pm$ 3.8
OS	5	89.4 $\pm$ 3.0	25.0 $\pm$ 2.3	84.7 $\pm$ 3.1
LNDR	5	89.4 $\pm$ 3.7	25.7 $\pm$ 2.0	60.8 $\pm$ 5.2
<b>14 DÍAS</b>				
TA	5	107.3 $\pm$ 1.5	36.1 $\pm$ 1.4	169.0 $\pm$ 5.7
OS	5	99.0 $\pm$ 5.3	23.4 $\pm$ 1.0 &	68.6 $\pm$ 3.2 &
LNDR	7	86.3 $\pm$ 5.2	28.2 $\pm$ 1.0*	64.2 $\pm$ 4.4
<b>16 DÍAS</b>				
TA	5	107.3 $\pm$ 1.5	36.1 $\pm$ 1.4	169.0 $\pm$ 5.7
OS	5	108.4 $\pm$ 1.6	29.4 $\pm$ 1.4	122.1 $\pm$ 12.3
LNDR	5	105.6 $\pm$ 5.5	27.3 $\pm$ 1.9	141.3 $\pm$ 21.1
<b>PE</b>				
TA	24	107.3 $\pm$ 1.5	36.1 $\pm$ 1.4	169.3 $\pm$ 5.7
OS	14	114.4 $\pm$ 2.2	31.0 $\pm$ 1.3	160.7 $\pm$ 7.1
LNDR	12	111.8 $\pm$ 3.3	30.2 $\pm$ 1.6	149.0 $\pm$ 6.9

& p<0.05 vs. grupo con TA (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

\* p<0.05 vs. grupo con OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

## DISCUSIÓN

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

Los resultados de este estudio permiten sugerir que el sistema serotoninérgico del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe participa de manera estimulante o inhibitoria en la modulación de los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la pubertad y la primera ovulación.

La participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la secreción de la GnRH y las gonadotropinas que culminan con la primera ovulación sería diferente durante el desarrollo postnatal de la rata. Diversos estudios experimentales señalan que la función de este sistema de neurotransmisión es controversial. Las divergencias reportadas en la literatura sobre la participación de la 5-HT pueden deberse a que en la interpretación de los datos no se consideran ni la edad del animal en la que se realizan las manipulaciones experimentales, ni el medio hormonal. Con base en los resultados de este estudio tales variables parecen ser de gran importancia en el análisis de la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la pubertad.

Nuestros resultados muestran que la eliminación de la información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe al final de la fase infantil (día 21), resultó en el retraso de la edad de la apertura vaginal y no modificó el crecimiento y maduración folicular, ni la primera ovulación. Mientras que cuando dicha manipulación se realiza en la parte media de la fase juvenil (día 24 y 27) se incrementa la respuesta ovulatoria y disminuye el proceso de atresia folicular. En cambio, cuando la eliminación del núcleo se realizó al final de la fase juvenil (30 días) se bloqueó la ovulación y el proceso de atresia se incrementó. Estos eventos apoyan la idea de que los cambios observados por la eliminación de la información serotoninérgica del núcleo dorsal del rafe dependen de la edad del animal en la cual se realizan dichas manipulaciones.

Nuestros resultados sobre la cuantificación de la 5-HT en el hipotálamo son semejantes a los reportados por Watts y Stanley (1984) en que la concentración de 5-HT es baja durante la primera semana de vida de los animales y aumenta conforme el animal madura. Estos hechos nos permiten sugerir que en los días cercanos al nacimiento este sistema de neurotransmisión no está aún desarrollado por completo. Esta afirmación es apoyada por los estudios de Lidov y Molliver (1982a, b); Whitaker y Azmitia (1980), quienes mostraron que las bajas concentraciones de 5-HT en el neonato están aparejadas a un número reducido de neuronas serotoninérgicas funcionales. Los axones de estas neuronas invaden la mayoría de las áreas del telencéfalo en el día 21 de gestación, mientras que la innervación del hipotálamo y de las otras estructuras del SNC culmina en la tercera semana de vida del animal.

Otro de los factores que puede explicar la inmadurez del sistema serotoninérgico en el neonato, son los cambios en la biosíntesis de la 5-HT vinculados a la disponibilidad del triptofano, ya que existen evidencias de que en la rata neonatal y adulta la concentración de 5-HT varía en forma paralela a las del triptofano cerebral (Zeisel et al, 1981). Así mismo, la actividad de la triptofano hidroxilasa, enzima limitante de la biosíntesis del neurotransmisor, es baja al nacimiento y en el día 20 presenta una actividad similar a la del adulto (Deguchi y Barchas 1972).

Con base en estos datos, es posible pensar que el cambio en la concentración de la 5-HT en el hipotálamo es un reflejo del número de neuronas serotoninérgicas funcionales y su desarrollo dendrítico, así como de la disponibilidad del aminoácido precursor y de la actividad de la triptofano hidroxilasa. La concentración de 5-HIAA en el hipotálamo depende de la tasa de serotonina liberada y su metabolización por la enzima monoamino oxidasa A (MAO

A) (Bourgoin et al., 1977). Por lo que la alta concentración del 5-HIAA en el hipotálamo durante los primeros 4 días del desarrollo y su no paralelismo a las concentraciones de la 5-HT pueden deberse a que la capacidad de almacenamiento del neurotransmisor sea menor en las neuronas inmaduras, por lo que la 5-HT puede ser metabolizada por la **MAO A** más rápidamente en los animales durante la fase neonatal que en los adultos, tal y como propone Karki et al, (1976) (citado en Bourgoin et al, 1977).

En nuestro estudio se muestra que la concentración de NA y la actividad de la neurona se hacen evidentes a partir de la fase infantil. Esto nos permite sugerir que el incremento en la concentración del neurotransmisor pueda deberse a la inmadurez de la neurona NA durante la fase neonatal. Sin embargo, esta idea no coincide con lo reportado por Raum y Swerdloff (1986), quienes mostraron que la castración de animales inmaduros incrementa el recambio de la NA y cuando se realiza en la fase adulta su respuesta es menor. Se ha mostrado que en la fase infantil la concentración plasmática de la  $\alpha$ -fetoproteína empieza a disminuir y como consecuencia aumenta la concentración de estrógenos libres en plasma, lo que permite que éstos ejerzan sus efectos sobre el SNC (Frawley y Henrick, 1979). Por lo antes mencionado, es posible sugerir que los cambios observados en el sistema noradrenérgico en el animal en desarrollo están vinculados a los efectos de los esteroides gonadales, ya que se ha mostrado que los estrógenos aumentan el recambio de la NA en el hipotálamo (Axelrod et al. 1979, citado en Ojeda y Urbanski, 1994) y que las neuronas noradrenérgicas del núcleo del tracto solitario (A2), las cuales inervan la eminencia media del hipotálamo, poseen receptores a estrógenos (Jennes et al, citado en Ojeda y Urbanski, 1994).

Nuestros resultados muestran que durante el desarrollo prepuberal del animal, el sistema serotoninérgico y catecolaminérgico del hipotálamo presenta modificaciones. Estos cambios posiblemente están vinculados a la maduración de

los mecanismos neuroendócrinos que se suceden en el eje hipotálamo- hipófisis y que influyen sobre el inicio de la pubertad.

En la etapa infantil del desarrollo prepuberal se presenta un "pico" de secreción de la FSH y la concentración de LH es baja. Este "pico" es esencial para que el desarrollo folicular sea normal (Ojeda y Urbanski, 1994) y parece no estar vinculado al sistema serotoninérgico, ya que en nuestro estudio se muestra que en estos días la actividad de la neurona es baja. Este hecho difiere a lo propuesto por otros autores, quienes mostraron que entre el día 16 y 20 la serotonina estimula la secreción de la FSH (Becú- Villalobos et al, 1989), y la LH (Arias et al, 1990; Moguilevsky et al, 1985). Por lo que es posible sugerir que en los primeros días de la fase infantil uno de los factores que modula la secreción de la GnRH y como consecuencia las gonadotropinas, es que existe una etapa de sensibilización del hipotálamo al efecto modulador de la serotonina, lo cual se traduce en el aumento brusco en la concentración de la FSH. Tal y como propone Ojeda (1994). Además, Hompes et al, (1984) (citado en Ojeda y Urbanski, 1994) mostraron que alrededor de la segunda semana de vida el sistema productor de la GnRH es más reactivo a un estímulo despolarizador.

Nuestros resultados muestran que en el día 36 de vida del animal, que corresponde a la etapa del proestro temprano de la clasificación de la fase peripuberal propuesta por Ojeda et al, (1983), la actividad de la neurona serotoninérgica se mantiene alta, la dopaminérgica disminuye y la noradrenérgica aumenta ligeramente, estos hechos coinciden con lo ya observado en el animal prepúber por Advis et al, (1978) y en la tarde del proestro en el adulto por Kerdelhué et al, 1989 y Vitale et al, (1984). Con base en nuestros resultados y los de diversos autores, es posible que el pico de secreción de las gonadotropinas que precede la primera ovulación está vinculado a los cambios antes mencionados en los diferentes sistemas de neurotransmisión que actúan en el hipotálamo regulando la secreción de la GnRH.

Durante la etapa prepuberal no existe una correlación entre la actividad del sistema serotoninérgico y el desarrollo de los animales. La curva de crecimiento de los animales indica que su desarrollo es lento durante la fase neonatal, pero al final de la fase infantil su crecimiento se acelera, lo cual es más evidente en los días cercanos a la pubertad. Este hecho posiblemente está vinculado al patrón de secreción de la hormona de crecimiento durante el desarrollo prepuberal del animal, ya que se ha mostrado que al inicio de la fase infantil la concentración de GH en plasma es baja, pero se incrementa gradualmente durante la fase juvenil y la concentración de la hormona es mayor en esta fase que en la infantil (Ojeda y Urbanski, 1994; Ramaley y Phares, 1980), lo cual coincide con el crecimiento del animal observado en nuestro estudio y también a la mayor secreción de estrógenos.

El incremento en peso del útero durante el desarrollo prepuberal de la rata observado en nuestro estudio, refleja la mayor concentración de estrógenos libres durante esta etapa de la prepubertad del animal. El crecimiento del órgano es más evidente a partir del día dieciséis (etapa infantil), que corresponde a la fase en la cual la concentración de estrógenos libres en plasma aumenta, debido a la disminución de la  $\alpha$ -fetoproteína (Frawley y Henricks, 1979). El útero es un indicador biológico de la presencia de estrógenos en plasma, ya que induce la síntesis de proteínas, lo cual se refleja en el crecimiento del endometrio, miometrio y del órgano en general (Fink, 1988; Steinetz, 1973).

El retraso en la edad de la apertura vaginal acompañado de ovulación en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafe al final de la fase infantil (21 días), permite sugerir que la lesión afectó la secreción de las gonadotropinas lo que se tradujo en un retraso en la capacidad del ovario para producir estrógenos. Además, en estos animales se observó la disminución del peso corporal a los seis y diez días posteriores a la intervención. Este hecho podría estar relacionado con la disminución en la secreción de la hormona GH y como consecuencia retraso en

la pubertad (edad de la apertura vaginal, primer estro y primera ovulación) de manera semejante a lo observado por Ramaley y Phares, 1980), cuando se inhibe la secreción de la GH. Se ha mostrado que esta hormona estimula el desarrollo folicular y la formación de los receptores a la LH en las células de la granulosa y como consecuencia aumenta la secreción de estrógenos (Adams, 1988; Ojeda et al, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Existen evidencias que señalan que la disminución en la actividad del sistema serotoninérgico inducido por la destrucción de las neuronas productoras de serotonina, el bloqueo de la síntesis y liberación de la amina o de sus receptores, provoca insomnio en los animales e incrementa su actividad (Werner, 1988). En nuestro estudio se observó que este evento se acompañó de disminución del peso de los animales cuando fueron intervenidos al final de la fase infantil, mientras que en los lesionados en la fase juvenil no se modificó. Estos hechos nos permiten pensar que posiblemente los cambios observados en los animales con lesión en la fase juvenil, no se deban a modificaciones en el peso corporal.

En los animales con lesión del núcleo dorsal del rafe durante la fase juvenil (24, 27, y 30 días), no se modificaron la edad de la apertura vaginal y ni del primer estro vaginal. Sin embargo, dado que en los animales de 30 días disminuyó el peso del útero y ninguno de los animales ovuló podemos sugerir que la secreción de estrógenos fue suficiente para inducir la canalización vaginal, pero no para que se manifestaran los mecanismos de retroalimentación de los esteroides gonadales que culminan con la secreción de la GnRH, de la LH y la ovulación.

La eliminación de la información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe en los animales de 30 días, bloqueó la primera ovulación de manera semejante a lo observado por Meyer (1978) en el animal de la misma edad cuando se realiza la microinyección de 5,7-dihidroxitriptamina en el

núcleo dorsal del rafé y recibe el estímulo con PMSG, o en la rata adulto con lesión electrolítica del núcleo (Morello y Taleinsky, 1985). Nuestros resultados muestran que el efecto de la lesión del núcleo dorsal del rafé dependió del momento del desarrollo prepuberal del animal en la cual se realizó la manipulación de este núcleo, debido a que la ovulación se incrementa cuando se elimina dicha información en el día 24 ó 27, mientras que cuando se realiza en el animal de 21 días no se presentan cambios.

Estos resultados nos permiten sugerir que durante el desarrollo prepuberal de la rata el sistema serotoninérgico del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé participa en la regulación de los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la pubertad y la primera ovulación. En el animal de 30 días parecería ser indispensable, mientras que a los 24 y 27 días sería inhibitorio, y si se elimina a los 21 días su ausencia puede ser compensada. La idea de que la participación del sistema serotoninérgico es diferente en los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas a lo largo del desarrollo del animal ya había sido planteado previamente (Arias et al, 1990; Moguilevsky et al, 1985, 1987; Ayala et al, 1993).

El bloqueo de la ovulación provocado por la lesión del núcleo dorsal del rafé en el animal de 30 días podría ser el resultado de la alteración de la secreción "cíclica" de la LH, que en la rata prepúber ocurre en el día del proestro tardío. El hecho de que la administración de hCG en los días cercanos al primer estro vaginal restauró la ovulación en estos animales apoya esta idea. Al parecer la secreción de la FSH no se modificó por la falta de inervación serotoninérgica que se origina en este núcleo, dado que en los ovarios de estos animales se observaron folículos preovulatorios, aunque estos fueron atrésicos.

Se ha mostrado que las fibras serotoninérgicas que se originan en el núcleo dorsal del rafé ascienden hasta el hipotálamo y la eminencia media (Takeuchi,

1988; Frazer y Hensler, 1993). Estudios ultraestructurales han mostrado que en el área preóptica del hipotálamo existe una especialización sináptica entre la terminal serotoninérgica y la neurona GnRHérgica (Kiss y Halasz, 1985; Jennes et al, 1982; Soghomonian et al, 1988) y en la eminencia media con la terminal GnRHérgica (Jennes et al, 1982; Villar et al, 1984). Estos datos anatómicos apoyan la idea de que la falta de información serotoninérgica proveniente del núcleo dorsal del rafé podría estar modulando la secreción de la LH. Aunado a esto, en el animal adulto se ha mostrado que cuando se realiza la lesión electrolítica del hipotálamo disminuye la concentración de la serotonina y provoca la degeneración de las fibras serotoninérgicas que llegan a la eminencia media y disminuye la concentración de LH en plasma (Palkovits et al, 1977; Vitale et al, 1987).

Con base en nuestros resultados y los resultados anatómicos y bioquímicos de otros autores (Jennes et al, 1982; Kiss y Halasz, 1985; Soghomonian et al, 1988; Villar et al, 1984; Palkovits et al, 1977; Vitale et al, 1987) es posible sugerir que en animal de 30 días la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé regula de manera estimuladora la secreción "cíclica" de la GnRH y de la LH que culminan con la primera ovulación.

La lesión del núcleo dorsal del rafé no eliminó completamente la presencia de serotonina en el hipotálamo. Por lo tanto, la serotonina medida en estos animales puede ser la que se está sintetizando en el propio hipotálamo, ya que se ha mostrado que al parecer en el núcleo ventromedial existen somas productores de la amina (Takeuchi, 1987). Otra de las fuentes del neurotransmisor puede ser la que se este sintetizando en el núcleo medial del rafé, ya que se ha mostrado que parte de las fibras serotoninérgicas que llegan al hipotálamo se originan en este núcleo (Takeuchi, 1988; Soghomonian et al, 1988).

Nuestros resultados no muestran una correlación entre los cambios observados en la ovulación, la concentración de serotonina y la actividad de la

neurona serotoninérgica del hipotálamo, ya que la lesión disminuyó la concentración de 5-HT en el hipotálamo de todos los animales independientemente de la edad. Aunado a esto, no se observaron cambios significativos en la concentración de NA y DA y ni en la actividad de estos sistemas de neurotransmisión. Sin embargo, se ha mostrado que el sistema serotoninérgico, dopaminérgico y noradrenérgico regulan la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la primera ovulación (Arias et al, 1990; Moguilevsky et al, 1985, 1990). Si el sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo dorsal del raquí es uno de los moduladores de la secreción de la GnRH, entonces ¿ Como es la interacción de este sistema de neurotransmisión con la neurona productora de la GnRH?

Al parecer, la información que se origina en el núcleo dorsal del raquí estimula la secreción preovulatoria de la LH, mientras que la que se origina en el núcleo medial la inhibe (Morello y Taleisnik, 1985). El efecto estimulador que ejerce el núcleo dorsal sería por intermedio del sistema noradrenérgico del Locus ceruleus, ya que la administración de 5-HT en esta estructura evita el bloqueo de la ovulación inducido por la lesión de este núcleo. Estudios de inmunocitoquímica han mostrado que el Locus ceruleus recibe inervación serotoninérgica del raquí dorsal (Morello y Taleisnik, 1988). En cambio, el efecto inhibitorio que ejerce el núcleo medial del raquí, parecen estar mediado por sus efectos sobre la neurona productora del GABA, como se ha mostrado en el animal adulto (Morello y Taleisnik, 1989).

El bloqueo de la ovulación observado en los animales con lesión del raquí en el día 30, podría deberse a que en estos animales la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del raquí es el que toma el comando de los mecanismos de regulación y como consecuencia activa al sistema productor de GABA y se inhiba la secreción preovulatoria de la LH. Existen evidencias que el efecto inhibitorio del GABA, ya es evidente en el animal prepúber de 30 días de

edad (Moguilevsky et al, 1991). Además, es posible que con la eliminación de la información serotoninérgica del núcleo dorsal del rafe se pierda el efecto estimulante que ejerce la noradrenalina sobre la neurona GnRHérgica, el que ha sido mostradó a esta edad (Moguilevsky et al, 1990). Otro aspecto a considerar son los resultados reportados que muestran que el núcleo del rafe contiene predominantemente somas neuronales serotoninérgicos, sin embargo, también contiene neuronas dopaminérgicas que se localizan el borde dorsal del núcleo y se comunican con las del grupo A10 (Stratford y Witshafter, 1990). Por ello, no se puede desacartar que en los cambios observados, también participe el sistema dopaminérgico. En conjunto todos estos eventos posiblemente inhibieron los mecanismos neuroendócrinos que culmina la secreción preovulatoria de la GnRH, de la LH y la primera ovulación (Esquema 1).

Los resultados del presente estudio apoyan la idea de la existencia de dos sistemas serotoninérgicos separados anatómicamente que regulan la secreción de gonadotropinas de manera inversa. La información serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafe e inerva área preóptica modula de manera estimulante la secreción de la LH, que culmina con la ovulación y la secreción de los estrógenos, mientras que la que se origina en el núcleo medial y que inerva el hipotálamo medio basal puede representar el centro inhibitorio, como ya ha sido previamente reportado (Morello y Taleisnik, 1985; Morello et al, 1989).

El incremento en la respuesta ovulatoria observado en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafe en los animales con lesión en el día 24 ó 27 de edad, posiblemente es un reflejo de la diferencia en la participación de los sistemas de neurotransmisión en la regulación de la neurona GnRHérgica durante el desarrollo prepúberal de la rata (Arias et al, 1990; Moguilevsky et al, 1985, 1990, 1991). Al parecer, en el animal de 16 días los sistemas serotoninérgico y noradrenérgico inhiben la secreción de la LH, mientras que el GABAérgico la estimula (Moguilevsky et al, 1990, 1991). Por ello, si en el animal de 24 y 27 días

de edad se manifiesta la misma función de estos sistemas de neurotransmisión, es posible que la falta de información serotoninérgica que se origina en el raqué dorsal, evite que manifieste el efecto inhibitor que ejerce la noradrenalina en estas edades y que al tomar el comando el núcleo medial del raqué, se active a la neurona productora del GABA y como consecuencia se estimula la producción de la GnRH y de la LH, lo cual se reflejo en la respuesta ovulatoria de estos animales (Esquema 2).

En estos momentos no tenemos una explicación para el hecho de que en los animales con lesión al día 21 no se modificó la ovulación en el día del primer estro vaginal. Sin embargo, es posible suponer que la falta de efecto sea consecuencia de que los días 20-22 son una fase de transición en la que el animal es capaz de responder al estímulo de altas concentraciones de estrógenos en plasma, con liberación preovulatoria de LH (maduración del mecanismo de retroalimentación positiva de los esteroides ováricos), ya que previo a esta edad el eje hipotálamo-hipófisis es muy sensible al mecanismo de retroalimentación negativo que ejercen estas hormonas en la secreción de gonadotropinas (Ojeda y Urbanski, 1994).

La falta de ovulación en los animales con lesión del núcleo dorsal del raqué efectuada al día 30, parece no ser el resultado de modificaciones en la secreción de la FSH en los días posteriores a la intervención, debido a que el crecimiento folicular no se modificó, sin embargo, la mayoría de los folículos preovulatorios presentaron signo de atresia. Según diversos autores, durante la etapa juvenil se producen ondas de crecimiento folicular, evento que es regulado por la FSH, entre otras hormonas vía los cambios en la síntesis de AMP cíclico (Van Campelle et al, 1989). Con base en estos resultados es posible sugerir que el sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo dorsal del raqué no modula los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de la FSH y si los de la LH tal y como ha sido postulado por otros (Arias et al, 1990; Justo et al, 1989).

Al parecer la falta de información serotoninérgica que se originó en el núcleo dorsal modificó la maduración final de los folículos preovulatorios, ya que la eliminación de esta información estimuló el proceso de atresia en este tipo de folículo, tal como se observó en el estudio de la población folicular realizado en los días posteriores a la intervención. Estos folículos posiblemente estaban destinados a ovular en el día del primer estro vaginal, sin embargo, la incidencia de atresia en los ovarios de los animales con lesión del rafe en el día 30, aumentó marcadamente. Según diversos autores, en los días cercanos a la pubertad, estos folículos secretan estrógenos en concentraciones suficientes para activar al hipotálamo, lo que induce la secreción preovulatoria de las gonadotropinas que culmina con el crecimiento y maduración final de los folículos que culmina con la primera ovulación (Adams, 1988; Goldman, 1981; Ojeda y Urbanski, 1994; Ramírez, 1973). Por lo que es posible suponer que este pico de secreción de estrógenos no se produjo, posiblemente como resultado de la disminución de la capacidad de síntesis de los andrógenos por las células de la teca, por la disminución de la actividad de la C-17, 20 liasa e incremento de la progesterona; o bien debido a la disminución en la tasa de aromatización de los andrógenos a estrógenos por la falta de la LH. Eventos que han sido observados en otros modelos de estudio (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Shyamal 1994; Hsueh et al, 1994).

La atresia del folículo es un proceso cuyo mecanismo de regulación es complejo. Es difícil pensar que un solo factor explique el incremento en la atresia observado en los animales con lesión del rafe en el día 30. Al parecer la disminución del número de receptores a la FSH y la LH o la capacidad de unión de los mismos están vinculados al proceso de atresia (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Shyamal, 1994; Hsueh et al, 1994). Sin embargo, en nuestro estudio observamos que el incremento en el índice de atresia no se acompañó de modificaciones en el número de receptores a la LH en el folículo. Este hecho nos permite pensar que en los ovarios de estos animales entre los eventos que se

modificación, es la expresión de los receptores a las gonadotropinas, en particular los de la LH. Dicho fenómeno posiblemente fue uno de los factores que dieron origen a la atresia en los ovarios de estos animales.

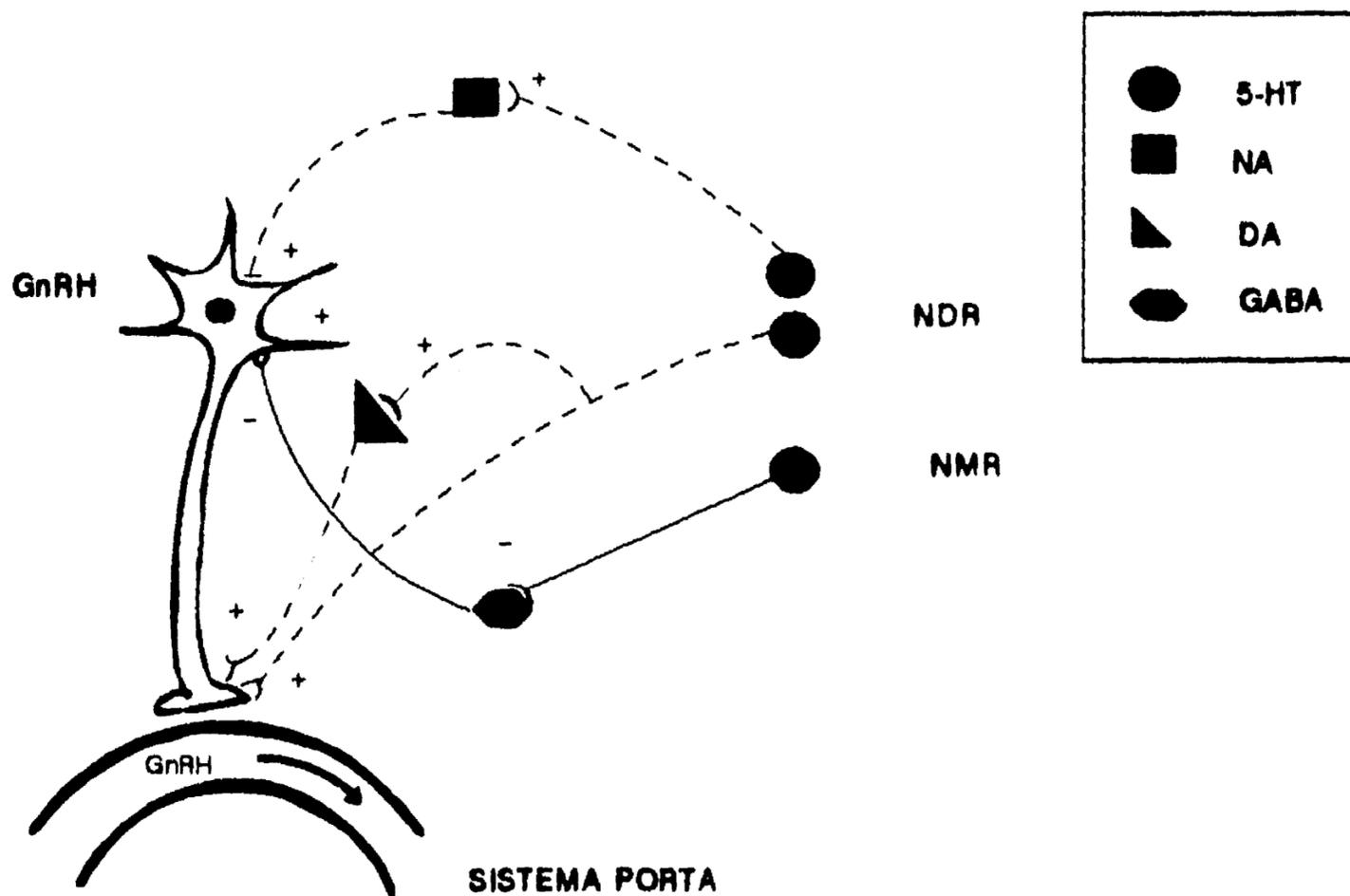
En cambio, en el animal de 27 días el incremento en el número de ovocitos liberados por animal ovulante se acompañó de disminución del índice de la atresia en el folículo. Esta respuesta diferencial del ovario a la falta de esa vía neural, posiblemente está vinculada al desarrollo del propio ovario, que se traduce en una respuesta diferente ante un estímulo. Esta idea es apoyada por las evidencias experimentales que muestran que la respuesta del ovario a la administración de PMSG es diferente durante el desarrollo del animal prepúber, ya que el número de ovocitos liberados frente a un mismo estímulo hormonal disminuye conforme el animal se acerca a la pubertad (Ojeda y Urbansky, 1994; Villavicencio et al, 1993).

El mecanismo por el cual la falta de información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé, se acompañó de modificaciones en la sensibilidad del folículo a la LH, y que se traduce en cambios en la secreción de estrógenos no se conoce. Sin embargo, es posible pensar que existe una vía de "comunicación neural" entre este núcleo y el ovario. Hasta el momento no se ha mostrado que el ovario reciba un aporte neural que se origina en este núcleo, por lo que es posible pensar que la información que parte de este núcleo no actúa directamente sobre el ovario, sino que su papel "modulador" sería sobre otro tipo de vía neural que actúa directamente en el ovario.

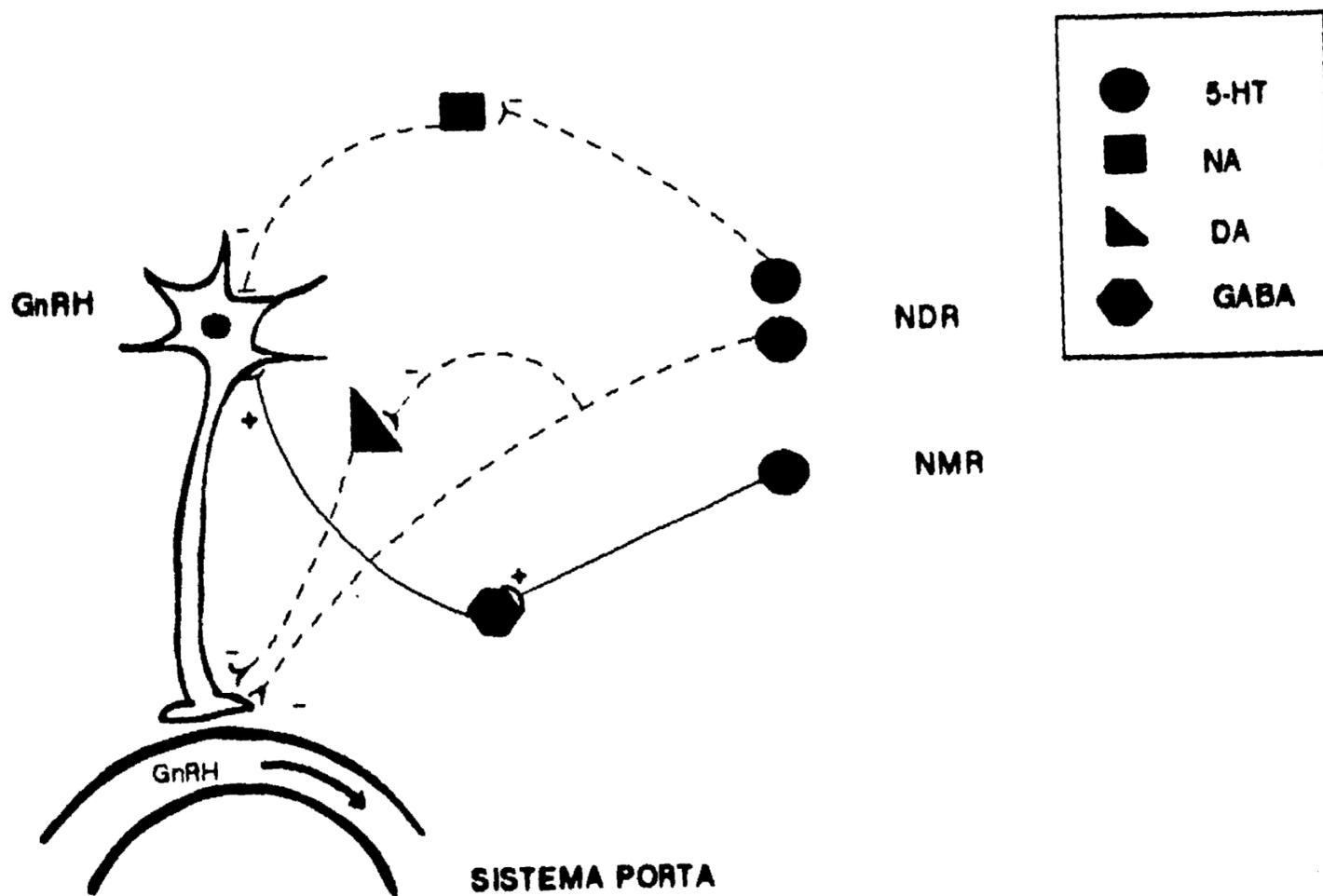
Por estudios de inmunocitoquímica se ha mostrado que la principal fuente de inervación serotoninérgica de la médula espinal se origina de los grupos celulares B1-B3 del rafé. Sin embargo, parte de dicha inervación también se origina en el núcleo dorsal y medial (Halliday et al, 1995). Estas evidencias anatómicas nos permiten apoyar la idea de una posible "comunicación neural" entre el rafé y el ovario.

La existencia de una comunicación de este tipo, entre las diferentes regiones del SNC y el ovario ha sido postulada previamente por otros autores (Crúz et al, 1989). Resultados previos han mostrado que cuando se elimina parte de la información que se origina en el núcleo dorsal del rafé, el número de ovocitos liberados por el ovario ipsilateral a la eliminación del núcleo se incrementa (Ayala et al, 1994). Estas evidencias aunadas a lo ya reportado nos permiten sugerir, que la regulación del crecimiento y maduración final del folículo y la ovulación esta vinculada a influencias neurales, además de las hormonales.

En conjunto nuestros resultados nos permiten sugerir que los cambios observados involucran el desarrollo de los diferentes sistemas de neurotransmisión, sus relaciones entre ellos y la neurona GnRHérgica, y la maduración del propio ovario, que se presentan durante las diferentes fases que caracterizan el desarrollo prepúberal de la rata y que influyen en el inicio de la pubertad. Sin embargo, los resultados de este estudio no permiten dilucidar si los cambios en la ovulación observados, se deben a la participación de la información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé sobre la regulación de la secreción de la LH, en la reactividad del folículo ovárico a ésta; o es una combinación de ambos.



Esquema 1.-Modelo propuesto de la posible regulación de la neurona GnRHérgica por los diferentes sistemas de neurotransmisión en el animal al final de la fase juvenil (30 días). El signo (+) indica efectos estimulatorios y el (-) inhibitorios. NA, noradrenalina; DA, dopamina; 5-HT, serotonina; GABA, aminoácido gaba aminobutírico; GnRH, hormona liberadora de las gonadotropinas; NDR, núcleo dorsal del rafe; NMR, núcleo medial del rafe. Las líneas continuas representa las vías que posiblemente se mantiene después de la lesión del rafe dorsal, las discontinuas la vías que se modificaron después de la lesión.



Esquema 2. Modelo propuesto de la posible regulación de la neurona GnRHérgica por los diferentes sistemas de neurotransmisión en el animal durante la parte media de la fase juvenil ( 24 y 27 días). El signo (+) indica efectos estimulatorios y el (-) inhibitorios. NA, noradrenalina; DA, dopamina; 5-HT, serotonina; GABA, aminoácido gaba aminobutírico; GnRH, hormona liberadora de las gonadotropinas; NDR, núcleo dorsal del rafé; NMR, núcleo medial del rafé. Las líneas continuas representan las vías que posiblemente se mantienen después de la lesión del rafé dorsal, las discontinuas las vías que se modificaron después de la lesión.

## CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en este estudio y en los antecedentes del mismo podemos proponer que:

1.-En la rata hembra el sistema serotoninérgico del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé modula los mecanismos neuroendócrinos que regulan el inicio de la pubertad.

2.-La participación del sistema serotoninérgico que inerva al hipotálamo y se origina en el núcleo dorsal del rafé, en la regulación de la primera ovulación varia durante la etapa juvenil del desarrollo prepuberal.

3.-Es posible que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé ejerce una influencia estimulatoria en la regulación de la secreción "cíclica" de la LH y de los estrógenos.

4.-La información serotoninérgica del núcleo dorsal del rafé modifica posiblemente, por una vía neural no descrita hasta el momento la reactividad del folículo a las gonadotropinas.

5.-El sistema serotoninérgico del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé modula posiblemente por una vía neural no descrita hasta el momento, la maduración y la atresia de los folículos ováricos, y sus efectos dependen del medio ambiente hormonal en que se encuentre el animal.

6.-Parece existir una comunicación neural entre el núcleo dorsal del rafé y el medial y ambos participan en la regulación de la secreción de la LH y la primera ovulación.

7.-La eliminación de la información serotoninérgica del núcleo dorsal del raquí modifica la actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo de manera diferencial durante el desarrollo prepúbere del animal.

8.-La eliminación de la información serotoninérgica que se origina en el núcleo del raquí dorsal provoca cambios en la primera ovulación, por intermedio de otros sistemas de neurotransmisión.

## **PERSPECTIVAS**

De los resultados obtenidos en el estudio de la participación del sistema serotoninérgico del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé, en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la pubertad, surgieron diversas interrogantes, algunas de las cuales se plantean a continuación.

¿Cuáles son las causas por las que la eliminación de la información serotoninérgica del núcleo dorsal del rafé modifica la ovulación en el animal prepúber, dependiendo de la edad o del ambiente hormonal cuando se elimina dicha información?

¿La respuesta diferencial del animal prepúber a la eliminación de la información serotoninérgica del núcleo dorsal del rafé, se debe a modificaciones en el número de receptores a la serotonina en el hipotálamo o a la afinidad de los mismos?

¿Existe una vía de información neural que existe entre el núcleo dorsal del rafé y el ovario?

¿Cuáles son los mecanismos que se modifican en el ovario, cuando se elimina la información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafé?

¿La falta de la información serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé, modifica la afinidad de los receptores a las gonadotropinas y en particular a la LH?

¿Cuáles son las causas por las que la eliminación de la información del núcleo dorsal del rafé provoca efectos diferenciales en la maduración del folículo ovárico, los que dependen del momento en que se elimine dicha información?

## BIBLIOGRAFIA

- Adams L.A. y Steiner R.A. (1988). Puberty. **Rev. Reprod. Biol.**, **10**: 1-52.
- Advis J.P., Simpkins J.W., Chen H.T. y Meites J. (1978). Relation of biogenic amines to onset of puberty in the female rat. **Endocrinology**, **103**:11-16.
- Advis J.P., Andrews W.W. y Ojeda S.R. (1979). Changes in ovarian steroidal and prostaglandin E responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat. **Endocrinology**, **104**: 653-658.
- Aghajanian G.K. y Bloom F.E. (1967). The formation of synaptic junctions in developing rat brain: A quantitative electron microscopic study. **Brain Res.**, **6**:716-727.
- Andrews, W.W. y Ojeda, S. R. (1977). On the feedback actions of estrogen on gonadotropin and prolactin in infantile female rats. **Endocrinology**, **101**: 1571-1523.
- Araki S., Toran-Allerand D., Ferin M. y Vande-Wiele R.L. (1975). Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (Gn-RH) during maturation in the rat: Ontogeny of regional hypothalamic difference. **Endocrinology**, **97**: 693-708.
- Arendash G.W. y Gallo R.V. (1979). Effect of lesions in the suprachiasmatic nucleus-retrochiasmatic area on the inhibition of pulsatile LH release induced by electrical stimulation on the midbrain dorsal raphe nucleus. **Neuroendocrinology**, **28**: 349-357.
- Arias P.B., Szwarcfarb D.C., Carbone S.R., Sverlik R. y Moguilevsky J.A. (1990). In vivo and in vitro studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in peripubertal female rats. **Brain Res.**, **523**: 57-61.
- Ayala M.E., Rosas P. y Domínguez R. (1993). Effects of serotonergic blockade provoked at different ages on spontaneous and induced puberty in the female rat. **Med. Sci. Res.**, **21**: 509-511.
- Ayala M.E., Rosas P. y Domínguez R. (1994). Different effects on unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation. **Brain Res. Bull.**, **34**: 27-30.
- Barofsky A. (1975). Progesterone induced luteinizing hormone release in oestrogen-primed ovariectomized rats following destruction of midbrain inputs to the supraquiasmatic nuclei. **J. Endocrin.**, **66**: 285-286.

Barofsky A.L. (1979). Median raphe stimulation and sham procedures inhibit the LH surge. **Neuroendocrinology**, **28**: 358-370.

Becú-Villalobos D. y Lacau-Mengido I. M. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. **Act. Physiol. Pharmacol. Latinoam.**, **40**: 1-17.

Becú-Villalobos D. y Libertun C. (1986). Ontogenesis of (3H)serotonin binding sites in the hypothalamus of the female rat: Relation of serotonin-Induced LH release in moxestrol-pretrated rats. **Dev. Brain Res.**, **25**: 111-116.

Becú-Villalobos D. y Lacau-Mengido I.M. (1989). Developmental changes in FSH secretion induced by 5-hydroxytryptophan, naloxone and haloperidol in male and female rats. **Dev. Brain. Res.**, **47**: 181-186.

Bleier R., Cohn P. y Siggelkow I.R. (1979). A cytoarchitectonic atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat. En: P.J. Morgane y J. Panksepp (eds). **Anatomy of the hypothalamus**. Mercei Dekker, Inc, New York. pp 137-219.

Beigon A., Bercovitz H. y Samuel D. (1980). serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. **Brain Res.**, **187**: 221-225.

Bourgoin S., Artaud F., Adrien J., Héry F., Glowinsky J. y Hamon M. (1977). 5-hydroxytryptamine catabolism in the rat brain during ontogenesis. **J. Neuroch.**, **28**: 415-422.

Brown P.S. (1971). Pituitary follicle-stimulating hormone in immature female rats treated with drugs that inhibit the synthesis or antagonize the actions of catecholamines and 5-hydroxytryptamine. **Neuroendocrinology**, **7**: 183-192.

Bukovsky A., Chen T.T., Wimalesen J. y Caudle M.R. (1993). Cellular localization of luteinizing hormone receptor immunoreactivity in the ovaries of immature, gonadotropin-primed and normal cycling rats. **Biol Reprod.**, **48**: 1367-1382.

Carbone S., Szwarcfarb B., Otero M.E. y Moguilevsky J.A. (1992). Effects of ovarian steroids on the gonadotropin response to N-Methyl-D-Aspartate and on hypothalamic excitatory amino acid levels during sexual maturation in female rats. **Endocrinology**, **130**: 1365-1370.

Cramer O.M. y Barraclough Ch.A. (1978). The actions of serotonin, norepinephrine, and epinephrine on hypothalamic processes leading to adenohipofyseal luteinizing hormone release. **Endocrinology**, **103**: 694-703.

Crowley W.R. y Enland F.P. (1981). Neurotransmitter systems anatomy and pharmacology En: N.T. Adler (ed.). **Neuroendocrinology of Reproduction, Physiology and Behavior** Plenum Press New York

Crúz, M.E., Jaramillo, L.P. y Domínguez, R. (1989) Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. **J. Endocrinology**, **123**: 437-439.

Dalkin A.C., Bowne G.A., Pieper D.R., Regiani S. y Marshall J.C. (1981). Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormonereceptors during sexual maturation in the rat. **Endocrinology**, **108**: 1658-1664.

Deguchi T. y Barchas J. (1972). Regional distribution and developmental changes of tryptophan hydroxylase activity in the rat brain. **J. Neuroch.**, **19**: 927-929.

Domínguez R., Chávez R. y Cruz M.E. (1991). La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: R. Domínguez (ed.). **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. UNAM-PURRUA, México, pp 161-192.

Fink G. (1986). The endocrine control of ovulation. **Sci. Prog. Oxf.**, **70**: 403-423.

Fink G. (1988). Gonadotrophin secretion and its control En: E. Knobil y J. Neill.(eds.) **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, pp 1349-1378.

Frankfurt M., Lauder J.M. y Azmitia E.C. (1981). The immunocytochemical localization of serotonergic neurons in the rat hypothalamus. **Neuros. Lett.**, **24**: 227-232.

Frawley L.S. y Henrick D.M. (1979). Model of gonadotropin secretion in infantile rats and the role of estrogen in feedback regulation. **Endocrinology**, **105**: 1064-1072.

Frazer A. y Hensler J.G. (1993). Serotonin. En: G.J. Siegel, B.W. Agranoff, R.N. Albers y P.B. Molinoff (eds.). **Basic neurochemistry**. Raven Press, New York, pp. 283-308.

Freeman M.E. (1994). The ovarian cycle of the rat. En: E. Knobil y J. Neill (eds.). **The physiology of reproduction**. Raven Press, New York, pp 1893-1928.

Glass D. J. , Mastran T. y Nett T. M. (1986). Effects of estradiol and progesterone on the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) immunoreactive neural system of the anaestrous ewe. **Brain Res.** , **381**: 336-344.

Goldman B. D. (1981). Puberty. En: N.T. Adler (ed.). **Neuroendocrinology of Reproduction**. Plenum Press. N. Y. y London, pp 229-239.

Gore-Langton R.E. y Armstrong D.T. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: Knobil y J. Neill (eds.). **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, pp 571-627.

Goroll D., Arias P. y Wuttke W. (1994). Ontogenic changes in the hypothalamic levels of amino acid neurotransmitters in the female rat. **Dev. Brain Res.**, **77**: 183-188.

Greenwald G.S. y Shyamal, R.K. (1994). Follicular development and its control. En: Knobil y J. Neill (eds.). **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York, pp 629-724.

Halliday G., Harding A. y Paxinos G. (1995). Serotonin and Tachykinin systems. En: G. Paxinos (ed). **The Rat Nervous System**. Academic Press, New York, pp 929-969.

Hamon M., Javoy F., Kordon C. y Glowinski J. (1986). Synthesis and release of serotonin in the median eminence of the rat. **Life Sci.**, **9**: 167-168.

Hadfield H.G., Crane M.E., Nugent E.A., Milio C. y Narashimaschari N. (1985). Determination of 13 catecholamines, indolamines, metabolites and precursors in less than 20 minutes during a simple HPLC run. **J Liq. Chrom.**, **8**: 89-2697.

Hsueh A. J., Billing H. y Tsafiri A. (1994). Ovarian Follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. **Endocr. Rev.**, **15**: 707-723.

Héry M., Laplante E. y Kordon C. (1976). Participation of serotonin in the phasic release of LH. I. Evidence from pharmacological experiments. **Endocrinology**, **99**: 496-503.

Héry M., Laplante E. y Kordon C. (1978). Participation of serotonin in the phasic release of luteinizing hormone. II. Effects of lesions of serotonin containing pathways in the central nervous system. **Endocrinology**, **102**: 1019-1025.

Hirshfield A.N. y Migdley A.R. (1978). Morphometric analysis of follicular development in the rat. **Biol. Reprod.**, **19**: 597-605.

Jennes L., Beckman W.C., Stumpf W.E. y Grzanna R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. **Exp. Brain. Res.**, **46**: 331-338.

Jennes L., Stumpt W.E. y Sheedy M.E. (1985). Ultrastructural characterization of gonadotropin-releasing hormone (GnRH)-producing neurons. **J. Comp. Neurol.**, **232**: 534-547.

Johnson, M.D. y Crowley W.R. (1986). Role of central serotonin systems in the stimulating effects of ovarian hormones and naloxone on luteinizing hormone release in female rats. **Endocrinology**, **118**: 1180-1186

Justo S.N., Rossano G.L., Szwarcfarb B., Rubio M C y Moguilevsky J.A. (1989). Effect of serotonergic system on FSH secretion in male and female rats: Evidence for stimulatory and inhibitory actions. **Neuroendocrinology**, **50**: 382-386.

Kerdelhué B., Bojna F., Lesieur P., Pasqualini C., El Abad A., Lenoir V., Doviller P., Chiueh M.C. y Palkovits M. (1989). Median eminence dopamine and serotonin neuronal activity. **Neuroendocrinology**, **49**: 176-180

Kiss J. y Halasz B. (1985). Demonstration of serotonergic axons terminating on luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. **Neuroscience**, **14**: 69-78.

Kordon C., Enjalbert A. Héry M. Joseph-Bravo P.I., Rotsztejn W. y Ruberg M. (1980). Role of neurotransmitters in the control of adenohipophyseal secretion. En: P.J. Morgane, J. Panksepp y M.D. ChKer (eds). **Handbook of the Hypothalamus**, pp 253-286.

Kordon C., Drouva, S. Gonzalo, M. E. y Richard I.W (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: Knobil y j. Neill (eds.). **The Physiology of Reproduction**. Raven press, New york, pp. 1621-1682.

Lidov H.G. y Molliver M.E. (1982). An immunohistochemical study of serotonin neuron development in the rat: Ascending pathways and terminal fields. **Brain Res. Bull.**, **8**:389-430.

Lidov H.G. y Molliver M.E. (1982)b. Immunochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. **Brain Res. Bull.**, **9**: 559-604.

Luna L.G. (1975). Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Co., New York, pp. 21.

Mena-Valdivia A., Nava E.E. y Malacara H.M. (1995). The opioid system and excitatory amino acids in the onset of puberty in female rats. **Arch. Med. Res.**, **26**: 269-272.

Meyer C.D. (1978). Hypothalamic and raphe serotonergic systems in ovulation control. **Endocrinology**, **103**: 1067-1077.

Meyer C.D. y Eadens J.D. (1985). The role of endogenous serotonin in phasic LH release. **Brain Res. Bull.**, **15**: 283-286.

Meijs-Roelofs H.M., Van Campell W.A. Van Leeuwen, E.C. y Kramer P. (1990). Short and Long-term effects of an LHRH antagonist given during the prepubertal period on follicle dynamics in the rat. **J. Endocrinology**, **124**: 247-253.

Moguilevsky J.A., Faigon M.R., Scacchi P. y Szwarcfarb B. (1985). Effect of serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats. **Neuroendocrinology**, **40**: 135-138.

Moguilevsky J.A., Faigon M.R., Scacchi P. y Szwarcfarb B. (1987). Role of sexual differentiation of the hypothalamus in the differential effect of the serotonergic system on LH in prepubertal male and female rats. **Neuroendocrinology**, **45**: 274-277.

Moguilevsky J.A., Arias P., Szwarcfarb B., Carbone S. y Rondina D. (1990). Sexual maturation modifies the catecholaminergic control of gonadotrophin secretion and the effect of ovarian hormones on hypothalamic neurotransmitters in female rats. **Neuroendocrinology**, **52**: 393-398.

Moguilevsky J.A., Justo G., Justo S., Szwarcfarb B., Carbone S. y Scacchi P. (1990). Modulatory effect of testosterone on the serotonergic control of prolactin secretion in prepubertal rats. **Neuroendocrinology**, **51**: 197-201.

Moguilevsky J.A., Carbone S., Szwarcfarb B. y Rondina D. (1991). Sexual maturation modifies the GABAergic control of gonadotrophin secretion in female rats. **Brain Res.**, **563**: 12-16.

Montagne M. y Calas A. (1988). Serotonin and endocrinology the pituitary. En: N.N. Osborne, M. Hamon (eds.). **Neuronal Serotonin** John Wiley & Sons, New York pp. 271-304.

Montemayor M.E., Clark A.S. Lynn D.N. y Roy E.J. (1990). Modulation by norepinephrine of neuronal responses to estradiol. **Neuroendocrinology**, **52**: 473-480.

Morello H., Caligaris L., Haymal B. y Taleisnik S. (1989). Inhibition of proestrous LH surge and ovulation in rats evoked by stimulation of the medial raphe nucleus involves a GABA-mediated mechanism. **Neuroendocrinology**, **50**: 81-87.

Morello H. y Taleisnik S. (1985). Changes of the release of luteinizing hormone (LH) on the day of proestrus after lesions or stimulation of the raphe nuclei in rats. **Brain Res.**, **360**: 311-317.

Morello H. y Taleisnik S. (1988). The inhibition of proestrous LH surge and ovulation in rats bearing lesions of the dorsal raphe nucleus is mediated by locus coeruleus. **Brain Res.**, **440**: 227-231.

Morilac D.A. y Ciaranello R.D. (1993). Ontogeny of 5-hydroxytryptamine receptor immunoreactivity in the developing rat brain. **Neuroscience**, **55**: 869-880.

Ojeda S.R., Aguado L.I. y White S.S. (1983). Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: The rats as a model. **Neuroendocrinology**, **37**: 306-313.

Ojeda S.R., Urbanski H.F. y Ahmed C.E. (1986). The onset of female puberty: Studies in the rat. **Rec. Prog. Hor. Res.**, **42**: 385-440.

Ojeda S.R. y Urbanski H.F. (1988). Puberty in the rat. En: E. Knobil y J. Neil (eds.). **The Physiology of Reproduction**. Plenum Press, New York, pp. 1699-1737.

Ojeda S.R., Smith-White S., Advis J.P., Andrews W.W. y Aguado (1990). First preovulatory gonadotropin surge in the rodent. En: M.M. Grumbach, P.C. Sizonenko y M.L. Albert (eds.). **Control of the Onset of Puberty**. Williams & Williams, USA, pp 156-177.

Ojeda S.R., and Urbanski H.F. (1994). Puberty in the rat. En: E. Knobil y J. Neil (eds.). **The Physiology of Reproduction**. Plenum Press, New York, pp. 363-409.

O'steen W.K. (1964). Serotonin suppression of luteinization in gonadotrophin-treated, immature rats. **Endocrinology**, **74**: 885-888.

O'steen W.K. (1965). Suppression of ovarian activity in immature rats by serotonin. **Endocrinology**, **77**: 937-939.

Palkovits M., Saavedra J.M., Jacobowitz D.M., Kizer J.S., Zaborovski L. y Brownstein M.J. (1977). Serotonergic innervation of the forebrain: Effect of lesions on serotonin and triptophan hydroxylase levels. **Brain Res.**, **130**: 121-134.

Parisi M.N., Vitale M.L., Chiochio S.R. y Tramezzani J.H. (1983). Serotonin levels in rat median eminence change during the estrous cycle. **Acta Physiol. Latinoamer.**, **33**: 279-281.

Prazantelli M.R. (1992). Serotonin receptor ontogeny Effects of agonist in 1-day-old rats. **Pharm. Bioch. Behv.**, **43**: 1273-1277.

Ramaley J.A y Phares C.K. (1980). Delay of puberty onset in females due to supression of growth hormone. **Endocrinology**, **106** 1989-1993.

Ramírez V.D. (1973). Endocrinology of puberty. En **Handbook of Physiology**. American Physiological Society. Washington, pp 1-28

Raum J.W. y Swerdloff R.S. (1986). The effect of hypothalamic catecholamine synthesis inhibition by  $\alpha$ -methyltyrosine on gonadotropin secretion during sexual maturation in the male wistar rat. **Endocrinology**, **119** 168-175.

Raum W., Glass A. y Swerdloff R. (1980). Changes in hypothalamic catecholamine neurotransmitters and pituitary gonadotropins in the immature female rat: Relationships to the gonadostat theory of puberty onset. **Endocrinology**, **106**: 1253-1258.

Ruzsas C., Limonta R. y Martini L. (1982). Role of serotonergic neurons in the control of gonadotrophin and prolactin secretion in the rat. **J. Endocrinology**, **94**: 83-89.

Salas M. y Torrero C. (1991). Efecto de la estimulación anogenital sobre el desarrollo de la apertura vaginal de la rata. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, 8 al 12 de Séptiembre; Colima, Col. C115

Salas M., Torrero C., Pulido S. y Pérez H. (1991). Acciones neurotrópicas de las hormonas tiroideas durante la ontogenia neuronal. En M Salas (ed). **Ontogenia Neuronal. Aspectos Comparativos y Mecanismos de Regulación**. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de Investigación Científica, México pp 177-198.

Schaechter J.D. y Wurtman R.J. (1990). Serotonin release varies with brain tryptophan levels. **Brain Res.**, **532**:203-210.

Schmidt G. y Sanders-Bush E. (1971). Thryptophan hydroxylase activity in developing rat brain. **J. Neuroch.**, **18**: 2549-2551.

Shannon N.J., Gunnet J.W. y Moore K.E. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. **J. Neuroch.**, **47**: 958-965.

Sherwood N.M. y Timiras P.S.(1970). A stereotaxic atlas of the developing rat brain.

Shivers B.D., Harlan R.E., Morell J.I. y Pfaff D.W. (1983). Absence of oestradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. **Nature**, **304**: 345-347.

Silverman A., Liune Y. y Witkin J.W. (1994). The gonadotropin-releasing (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry. En: E. Knobil y J. Neill (eds.). **The Physiology of Reproduction**. Raven Press, New York. pp 1683-1710.

Soghomonian J.J., Beradet A. y Descarries L. (1988). Ultrastructural relationships of central serotonin neurons. En: N.N. Osborne y M. Hamon (eds.). **Neuronal Serotonin**. John Wiley & Sons, New York, pp 57-92.

Steinetz B.G. (1973). Secretion and function of ovarian estrogens. En: R. O. Greep y E. Astwood (eds.). **Handbook of physiology**. American Physiological Society, Washinton. pp 439-466.

Stratford T. R. y Wirtshafter D. (1990). Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. **Brain Res.**, **511**: 173-176.

Takeuchi (1988). Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. En: M.N. Osborne y M. Hamon (eds.). **Neuronal Serotonin**. John Wiley & Sons, New York, pp 25-56.

Van Cappellen W. A., Meijs-Roelofs H. A., Kramer P. y Van Den Dungen H.M. (1989). Ovarian follicle dynamics in mmature rats treated with a luteinising iol hormone-releasing antagonist (org. 30276). **Biol Reprod.**, **40**: 1247-1256.

Van de Kar L.D., Karteszi M., Bethea C.L. y Ganong W.F. (1985). Serotonergic stimulation of prolactin and corticosterone secretion in mediated by different pathways from the mediobasal hypothalamus. **Neuroendocrinology**, **41**: 380-384.

Van de Kar L.D., Lorens S.A., Vodraska A., Green M., Van Orden D.E. y VAN ORDEN L.S. (1980). Effect of selective midbrain and diencephalic 5,7-dihydroxytryptamine lesions on serotonin content in individual preoptico hypothalamic nuclei and on serum luteinizing hormone level. **Neuroendocrinology**, **31**: 309-315.

Villar J.M., Chiocchio S.R., y Tramezani J.A. (1984). Origin and termination of dorsal raphe-median eminence projection. **Brain Res.**, **324**: 165-170.

Villavicencio J. , Flores A. y Dominguez, R. (1993). Age dependence of the ovulatory response to gonadotropins in prepubertal rats. **Med. Sci. Res.**, **21**: 69-71.

Vitale M.L., Parisi M.N., Chiocchio S.R. y Tramezzani J.H. (1984). Median eminence serotonin involved in the proestrus gonadotropin release. **Neuroendocrinology**, **39**: 136-141.

Vitale M.L., Villar M.J., Chiocchio S.R. y Tramezzani J.H. (1987). Dorsal raphe lesion alters the estrous cycle and the preovulatory gonadotropin release. **Neuroendocrinology**, **46**: 252-257.

Vitale M.L. y Chiocchio S.R. (1993). Serotonin, a neurotransmitter involved in the regulation of luteinizing hormone release. **Endocrine Reviews**, **14**: 480-493.

Wallace J.A., Petrusz P. y Lauder J.M. (1982). Serotonin immunocytochemistry in the adult and developing rat brain: methodological and pharmacological considerations. **Brain Res. Bull.**, **98**: 117-119.

Watts A.G. y Stanley H.F. (1984). Indolamines in the hypothalamus and area of the midbrain raphe nuclei of male and female rats throughout postnatal development. **Neuroendocrinology**, **38**: 461-466.

Weiner R.I., Findell P.R. y Kordon C. (1988). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of LH and prolactin. En: E. Knobil y J. Neill (eds.). **The Physiology of Reproduction**. Plenum Press, New York, pp 1235-1281.

Werner P. K. (1988). Serotonin and Sleep. En: M.N. Osborne y M. Hamon (eds). **Neuronal Serotonin**. John Wiley & Sons, New York, pp 153-170.

Whitaker-Azmitia P.M. y Azmitia C.E. (1980). Autoregulation of fetal serotonergic neuronal development: Role of high affinity serotonin receptors. **Neurosci. Lett.**, **67**: 307-312.

Wray S. y Hoffman G. (1985). Postnatal morphological changes in rat LHRH neurons correlated with sexual maturation. **Neuroendocrinology**, **45**: 93-97.

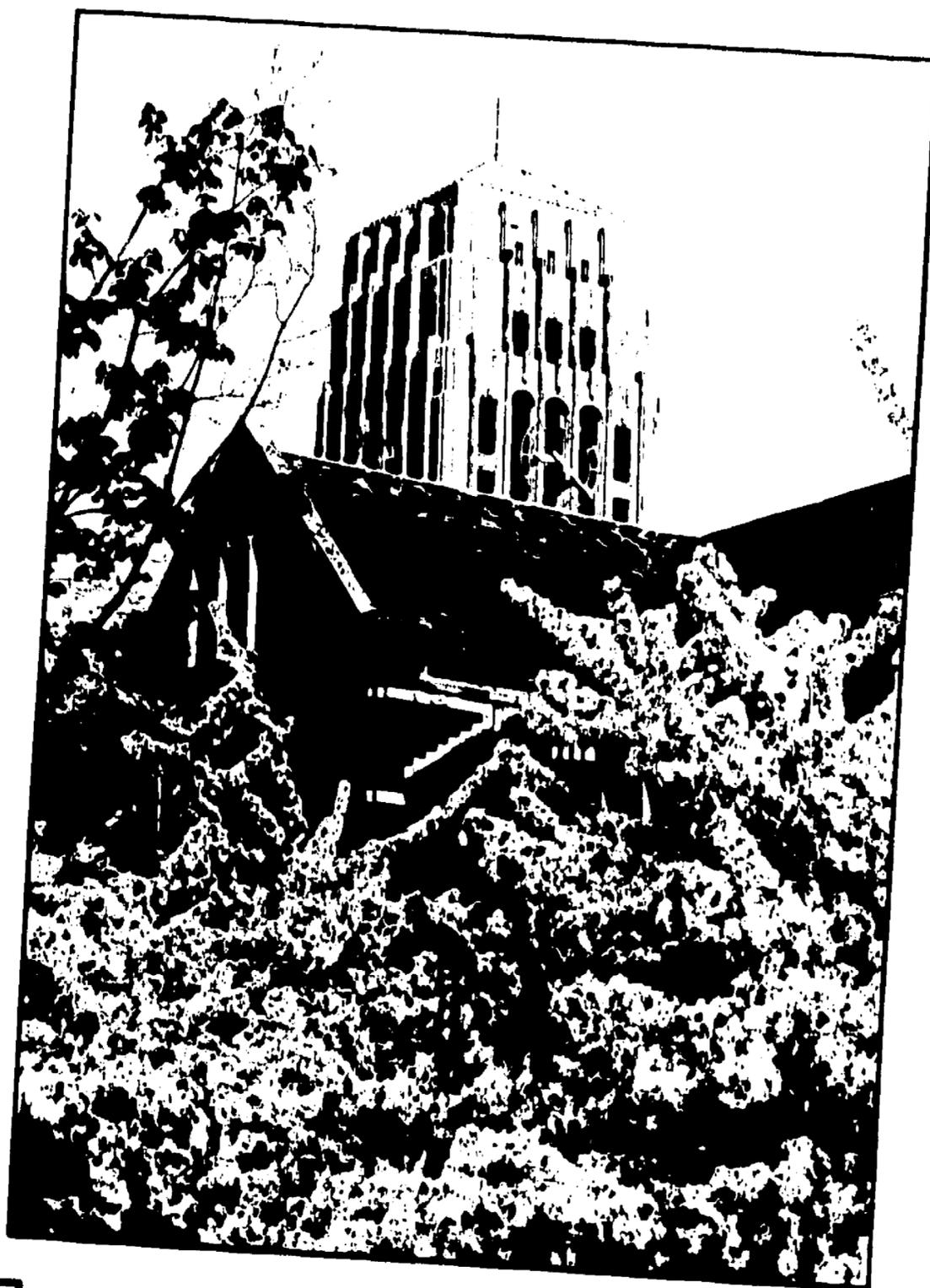
Wuttke W., Hofmann K., Lamberts R. y Hohn K.G. (1980). The role of monoamines in female puberty. **Fed. Proc.**, **39**: 2379-2383.

Zeisel S.T., Mauron Ch., Watkins C.J. y Wurtman R.J. (1981). Developmental changes in brain indoles serum tryptophan and other serum neutral amino acids in the rat. **Dev. Brain Res.**, **1**: 551-564.

**PUBLICACIONES**

# SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION

Biology of Reproduction/Volume 50/Supplement 1



A. Rees Mihalley



# SSR

JULY 24-27, 1994 27TH ANNUAL MEETING  
UNIVERSITY OF MICHIGAN  
ANN ARBOR, MICHIGAN

FALLA DE ORIGEN

41 FERTILIZATION RATE AND EMBRYO DEVELOPMENT IN RELATION TO PERSISTENT FOLLICLES AND PERIPHERAL ESTRADIOL-17 $\beta$  IN BEEF COWS.

N. Ahmad\*, F.N. Schrick, R.L. Butcher and E.K. Inskeep. Animal and Vet. Sciences and Obstetrics and Gynecology, West Virginia University, Morgantown, WV.

Low doses of progestogens result in persistent follicles and impaired fertility in cattle. Effects of persistent follicles on recovery of oocytes/embryos, fertilization, and embryonic development were examined in beef cows. To produce persistent follicles, cows received, on Day 4 after estrus, a used Controlled Internal Drug Releasing device, for 9 days, and two injections of 20 mg prostaglandin (PG) F $\alpha_2$ , intramuscularly, 12 hours apart on Day 6 (PER; n = 22). Control cows received only PGF $\alpha_2$  on Day 6 so they would ovulate growing follicles (GRO; n = 22). Cows were observed for estrus twice daily, then mated to highly fertile bulls. Follicular development was monitored by ultrasonography on alternate days from two days before treatment began until estrus, then daily until ovulation. Cows were bled every other day from two days before treatment began through Day 6 after mating, when uteri were flushed nonsurgically. The ovulatory follicle had been observed longer and was larger in PER (14  $\pm$  1 days and 17.2  $\pm$  0.4 mm vs. 8  $\pm$  1 days and 14.6  $\pm$  0.4 mm in GRO; P < 0.01). Estradiol during the four days before ovulation was higher in PER (6.0  $\pm$  0.4 pg/ml) than in GRO (3.0  $\pm$  0.4; P < 0.01). Recovery of embryos was lower (64%) in PER than in GRO (90%; P < 0.05). Fertilization rate (97%) and numbers of accessory sperm in the zona pellucida (38  $\pm$  43) did not differ with treatment. Fewer embryos in PER had reached  $\geq$ 16 cell stage of development (14%) and were good morulae (14%) than in GRO (86% and 73%, respectively; P < 0.01). Death of embryos in cows with persistent follicles could be due to effects of elevated estradiol on either oocyte maturation or oviductal function. (Supported by USDA Grant 89-37240-4714 and Hatch Funds)

43 OVARIAN AND UTERUS ACTIVITY DURING PUERPERAL STAGE AND EARLY FETAL DEVELOPMENT IN THE COW. I.W. Santos\*, J.P. Neves\*, P.B. Gonçalves, Depto. de Clínica de Grandes Animais, Universidade de Santa Maria, Santa Maria, Rio Grande do Sul 97119-900, Brazil.

The aim of the present study was to characterize the follicular growth and uterus variation during the puerperal stage in the cow. Also, the early fetal development was investigated by ultrasonography to help in the early pregnancy diagnosis. Gynecological and ultrasonographic exams were performed in all cows. An ultrasonic machine, brand Pie Medical Inc. 450 with a linear transducer of 5 MHz, was used for the ultrasonic exams. Fifteen cows were examined from 8<sup>th</sup> to 40<sup>th</sup> day after parturition. The ovarian activity was observed to initiate before of the 10<sup>th</sup> day of the puerperal stage. The onset of ovarian activity was not influenced by the type of parturition. However, the lochia persisted for longer period and the uterine involution was slower when dystocia had occurred (p < 0.001). The development of the fetal anatomy was observed until the 50<sup>th</sup> day of pregnancy in 142 cows of the Charolais breed. The growth of the head-rump of the fetus and the diameter of the embryonic vesicle was observed from 23<sup>rd</sup> to 50<sup>th</sup> day after artificial insemination. The early pregnancy diagnosis was possible to be performed at 24.1  $\pm$  0.5 days after fertilization. Furthermore, the development of fetal anatomy was feasible to be investigated in the 50 days period of pregnancy. Based on these observations, we conclude that the ovarian activity begins in the first days of the puerperal stage. Also, the uterine involution, uterine contents and fetal development can be determined by ultrasonography in the cow.

42 MODIFICATIONS IN FOLLICULAR POPULATION INDUCED BY LESION OF THE DORSAL RAPHE NUCLEUS LESION (DRN). M.E. Ayala and R. Dominguez. UIBR. FES-Zaragoza UNAM. AP 9-020, México D.F.

Bilateral electrolytic lesions on the DRN of 30-day old rats blocked ovulation, while the same treatment performed on 24 or 27-day old animals resulted in an increase in the number of ova shed by ovulating animals. When the lesion was performed on 21-day old animals ovulation was not modified. Those animals with ovulation blockade partially ovulated when hCG was injected. Because the ovaries of rats with unilateral or bilateral lesions on the hypothalamus resulting in the blockade of ovulation show changes in follicular growth and atresia, the follicular population in the ovaries of control and rats with bilateral lesions on the DRN was analyzed.

The results of the number and mean diameter (in  $\mu$ m) of healthy and atretic follicles in control (C) and rats with a lesion in DRN are present in the table.

Group	Number of follicles		follicular diameter	
	Healthy	Atretic	Healthy	Atretic
C	65.4 $\pm$ 2.3	24.1 $\pm$ 1.4	182.8 $\pm$ 4.0	324.1 $\pm$ 4.1
Lesion				
21-day	63.0 $\pm$ 5.0	14.5 $\pm$ 2.7*	196.0 $\pm$ 4.5*	325.3 $\pm$ 16.0
24-day	69.2 $\pm$ 3.7	27.0 $\pm$ 5.5	180.0 $\pm$ 3.5	294.2 $\pm$ 9.0*
27-day	61.5 $\pm$ 9.9	20.2 $\pm$ 2.3	183.0 $\pm$ 4.7	361.0 $\pm$ 17.0
30-day	69.8 $\pm$ 3.9	39.5 $\pm$ 6.3*	161.0 $\pm$ 3.3*	320.5 $\pm$ 9.6

\* p < 0.05 vs. control group (ANDEVA followed by Tukey's test)

Present results suggest that the lack of ovulation and poor ovulatory response to hCG in those animals with a bilateral lesion of DRN done at 30-days of age are related to an increase in the number of atretic follicles and a low follicular development. Supported by PUIS, PADEP and DGAPA grant IN210893

44 AN AUTORADIOGRAPHIC STUDY OF [<sup>125</sup>I]hCG AND [<sup>125</sup>I]FSH BINDING TO FOLLICLES IN EARLY POSTPARTUM BEEF COWS.

Melissa Rollosson, Joe W. Crim\* and Terry E. Kiser.\* Dept. of Animal and Dairy Science and Dept. of Zoology, University of Georgia, Athens, GA.

Studies are not available which have comprehensively assessed the binding of luteinizing hormone (LH) and follicle stimulating hormone (FSH) to follicles on the ovaries of suckled and acutely weaned cows. The objective of this study was (1) to demonstrate an *in situ* autoradiographic technique for measurement of LH and FSH binding to follicles on the ovary and (2) to determine preliminarily the effect of suckling on the binding of these gonadotropins to ovarian follicles of early postpartum cows.

Mature cows, 34  $\pm$  31 days postpartum, were allowed to either suckle their calves (S, n = 3) until slaughter or were acutely weaned (AW, n = 3) 72h prior to slaughter. Blood samples were collected prior to slaughter to profile serum LH. Ovaries were collected at slaughter, snap frozen and serially sectioned (30  $\mu$ m) on a cryostat. Gonadotropin binding was measured by incubating adjacent sections from each ovary with 500 pM [<sup>125</sup>I]hCG or 100 pM [<sup>125</sup>I]FSH. Nonspecific binding was determined by addition of an excess of unlabeled hCG or FSH, respectively. Slides were rinsed, dried and then apposed to Hyperfilm-<sup>3</sup>H. Relative grain densities were quantified using a computerized image analysis program.

Neither mean serum LH nor basal serum LH concentrations differed between treatments (p > 0.1). However, LH pulse frequency was greater (p < 0.05) in AW cows.

For these initial samples, mean binding densities of gonadotropins to the largest follicle were greater for AW than S cows, with clear differences (p = 0.02) for FSH and a suggested trend (p = 0.18) for hCG. For the ovary with the largest follicle, the density of hCG binding for small (<5mm) follicles also tended to be greater (p = 0.07) in AW cows. Additional samples are required to clarify trends in hCG binding. Interestingly, in both groups some cows had individual follicles for which measurable binding for either hCG or FSH was absent or negligible.

These first observations indicate (1) applicability of *in situ* autoradiography to gonadotropin binding to the bovine ovary; (2) a quantitatively varied population of follicles on the ovaries of early postpartum cows; and (3) in initial samples, a clear change in FSH receptor content on individual largest follicles accompanying escape from the suckling influence.



# Different Effects of Unilateral and Bilateral Lesions of the Dorsal Raphe Nucleus on Puberty and First Ovulation

MARIA ELENA AYALA,<sup>1</sup> PATRICIA ROSAS AND ROBERTO DOMINGUEZ

*Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM, AP 9-020, CP 15000, México, D.F. México*

Received 9 February 1993; Accepted 30 November 1993

AYALA, M. E., P. ROSAS AND R. DOMINGUEZ. *Different effects of unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation.* BRAIN RES BULL. 34(1) 27-30, 1994. — The effects of unilateral and bilateral electrolytic lesions of the dorsal raphe nuclei (DRN) of 30-day-old rats, on the spontaneous and induced ovulation, were analyzed. The bilateral lesion and the lesion on the right side of the DRN delayed the age of first vaginal estrous. None of the animals with bilateral lesion on the DRN ovulated on the day of first estrous (0/8 vs. 12/15,  $p < 0.05$ ). The ovulation rate in animals with unilateral lesion on the DRN was similar to sham-operated animals, but the number of ova shed by ovulating animals increased in the ovary ipsilateral to the lesion (lesion on right DRN, right ovary:  $6.5 \pm 0.5$  vs.  $4.5 \pm 0.4$ ; lesion on left DRN, left ovary:  $6.4 \pm 0.3$  vs.  $4.2 \pm 0.4$ ,  $p < 0.05$ ). By the injection of human chorionic gonadotropin, ovulation was restored in rats with a bilateral lesion on the DRN (3/5 vs. 0/8,  $p < 0.05$ ). The present results suggest that serotonergic input to the hypothalamus, arising from the DRN, exerts a facilitatory influences on the control of luteinizing hormone release. To explain the increase in the number of ova shed by the left and right ovary, observed in rats with an ipsilateral lesion, we suggest the existence of a neural connection between the DRN and the ovary.

Puberty    Ovulation    Serotonin    Dorsal raphe nuclei    Asymmetry    Lateralization

THE serotonergic innervation of the hypothalamus arises from the dorsal and medial raphe nuclei (12). According to several reports, the serotonergic innervation arising from the dorsal raphe nuclei (DRN) modulates the release of gonadotrophins (10,14). In contrast, other reports suggest that it has an inhibitory role (1,2). In the female adult rat, a lesion on the DRN reduced the concentration of serotonin in the median eminence, and was followed by an increase in the preovulatory release of gonadotrophins 48–72 h later and a decrease 35–40 days thereafter, without affecting the number of ova shed by ovulating animals (14). The lesion provoked by local administration of 5,7-dihydroxytryptamine on the dorsal and median raphe nuclei, blocked pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG) induced ovulation and reduced the serotonin reuptake by the median eminence and arcuate nuclei (10).

We have previously shown that serotonergic denervation, provoked by *p*-chloroamphetamine, reduced the ovulatory response to PMSG treatment, and this effect was overridden by the injection of human chorionic gonadotrophin (hCG) after PMSG (3).

Because there is evidence for the existence of lateralization on hypothalamic mechanisms regulating ovulation in the adult

rat (5,6), we analyzed the effects of unilateral and bilateral lesions of the DRN on spontaneous and induced ovulation of prepubertal rats.

## METHOD

Fifty-eight 30-day-old female rats of the CII-ZV strain from our own stock were maintained under conditions of controlled lighting (lights on from 0500 to 1900 h) with free access to food and tap water. Vaginal opening was determined by daily checking and vaginal smears were taken after it occurred to determine the various stages of the estrous cycle. All the animals were killed on the morning of first vaginal estrous.

The animals were randomly allocated into the following experimental groups:

### Control Group

Thirteen animals were left untouched and killed on the day of first vaginal estrous.

### Sham-Operated Group

Fifteen animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (Anestesal, Smith Kline Norden de México, México) (35

<sup>1</sup>To whom requests for reprints should be addressed.

mg/kg body weight), placed in a stereotaxic apparatus, the skin opened, the skull drilled, and the electrode introduced on the left or right side of the DRN but no current was passed. The parameters used to introduce the electrode were those of the stereotaxic atlas of Sherwood and Timiras (11): AP 0.7 mm; L 3.3 mm with an angle of 30° related to the perpendicular; DV 6.4 mm.

#### Unilateral and Bilateral Lesions on the Raphe Nuclei

Twenty-five rats were anaesthetized, placed in the stereotaxic apparatus, and the electrode introduced as the sham-operated group. To produce the lesion of the DRN, the electrode (tip diameter 0.7 mm; tip length 0.3 mm) was connected to a radiofrequency lesion maker (Radionics Inc., Burlington, MA); the unilateral lesions were induced by raising the temperature of the tip of the electrode to 65°C for 5 s (nine rats on the left side and eight on the right side). The complete destruction of the nuclei (eight animals) was obtained when the tip of the electrode reached 70°C for 5 s.

Ten days after the lesion, a group of five rats with a bilateral lesion of the DRN was injected with 10 IU of hCG (Sigma Chemical Co. St. Louis, MO) subcutaneously and they were sacrificed 20 h after the injection.

The animals were killed by decapitation under ether anaesthesia. The oviducts were dissected and tubal ova removed and counted under a dissecting microscope. The ovaries and uterus were dissected and weighed. Brains were fixed in 10% formalin for at least 48 h, sectioned on freezing microtome at 100  $\mu$ m, and stained with cresyl violet. The ovaries were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin wax, sectioned serially at 10  $\mu$ m, stained with haematoxylin-eosin, and the follicular population was studied following the method of Hirshfield and Midgley (9). Only follicles with a mean diameter greater than 100  $\mu$ m were included.

Data on number of ova shed were analyzed by Kruskal-Wallis, followed by the Mann-Whitney *U*-test; the weight of the ovaries and uterus and number of follicles were analyzed by multifactorial analysis of variance (MANOVA) followed by Tukey's test. All values are expressed in means  $\pm$  SEM. Ovulation rate (number of ovulating rats/number of rats treated) was analyzed by Fisher's exact probability test.

#### RESULTS

There were no differences in the age of vaginal opening, first vaginal estrous, ovulation rate, number of ova shed by ovulating animals, body, ovarian, and uterine weights, between sham-operated animals on the left or right side of the DRN. For this reason their results were combined to form a single sham-operated group.

In comparison with the control group, the sham-operated animals presented a delay in the vaginal opening, and in the first estrous. They also showed less weight of the ovaries (V.O. 42.1  $\pm$  0.4 days vs. 37.2  $\pm$  0.4; F.V.O. 42.7  $\pm$  0.5 vs. 38.1  $\pm$  0.5; weight of the ovaries 30.0  $\pm$  1.9 vs. 37.3  $\pm$  2.3,  $p < 0.05$ ). No differences in ovulation rate, number of ova shed by ovulating animals and body and uterine weight were observed. For that reason the results obtained in animals with a lesion in the DRN were compared with sham-operated animals.

Figures 1 and 2 show examples of the unilateral and bilateral lesions produced in the DRN.



FIG. 1. Photomicrograph of a coronal section on the midbrain illustrating a unilateral lesion of the dorsal raphe nuclei (ULDR); SGP, substantia grisea periventricularis; A, aqueduct. 20 $\times$ .

The age of first vaginal estrous was delayed in animals with a bilateral lesion, or with a lesion on the right side of the DRN. In animals with unilateral lesion on the left side of the DRN, the age of first vaginal estrus was similar to sham-operated rats (Table 1).

The ovulation rate in rats with a unilateral lesion on the DRN was similar to sham-operated animals (7/9; 7/8 vs. 12/15, non-significant). None of the animals with bilateral lesion of the DRN ovulated on the day of first vaginal estrous (0/8 vs. 12/15,  $p < 0.05$ ). The number of ova shed by ovulating animals increased in those animals with a lesion on the right or left side of the DRN (right side lesion 10.1  $\pm$  1.0; left side lesion 10.3  $\pm$  0.6 vs. sham-operated 7.7  $\pm$  0.4,  $p < 0.05$ ). Such increase was observed only in the ovary ipsilateral to the lesion (Table 1).

The weight of the ovaries diminished in those animals with a bilateral lesion on the DRN (Table 1). Differences in body and uterine weight were not observed.

The number of preovulatory follicles, with a diameter  $> 500 \mu$ m, counted in the left ovary of rats with a lesion on the left side of the DRN was lower than in the right ovary (1  $\pm$  0.5 vs. 6.0  $\pm$  1.2,  $p < 0.05$ ). Such difference did not occur in the right ovary

FALLA DE ORIGEN

istence of such neural information arising from the DRN, passing through, or both, which participates in the regulation of LH release and modulates the ovulatory ability of the ipsilateral ovary.

#### ACKNOWLEDGEMENTS

Supported by DGAPA, grants ESP-200191 and IN-210893; PADEP, grant 030368 and PUIS, UNAM.  
We acknowledge Mrs. María L. Illescas for her technical assistance.

#### REFERENCES

1. Arendash, G. W.; Gallo, R. V. Serotonin involvement in the inhibition of episodic luteinizing hormone release during electrical stimulation of the midbrain dorsal raphe nucleus in ovariectomized rats. *Endocrinology* 102:1199-1206; 1978.
2. Arendash, G. W.; Gallo, R. V. Effect of lesions in the suprachiasmatic nucleus-retrochiasmatic area on the inhibition of pulsatile LH release induced by electrical stimulation of the midbrain dorsal raphe nucleus. *Neuroendocrinology* 28:349-357; 1979.
3. Ayala, M. E.; Rosas, P.; Domínguez, R. Effects of serotonergic blockade provoked at different ages on spontaneous and induced puberty in the female rat. *Med. Sci. Res.* 21:509-511; 1993.
4. Chávez, R.; Cruz, M. E.; Domínguez, R. Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: Effect of ipsi- and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinol.* 113:397-401; 1987.
5. Cruz, M. E.; Jaramillo, L. P.; Domínguez, R. Asymmetric ovulatory response induced by unilateral implant of atropine in the anterior hypothalamus of the cyclic rat. *J. Endocrinol.* 123:437-439; 1989.
6. Cruz, M. E.; Morán, J. L.; Jaramillo, L. P.; Domínguez, R. Differential effects of a unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rats. *J. Endocrinol.* 124:37-41; 1989.
7. Domínguez, R.; Cruz, M. E.; Chávez, R. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. VII ovarian workshop. Paracrine communication in the ovary: Ontogenesis and growth factors. Serono symposia USA. Tacoma, WA: 1988;37.
8. Domínguez, R.; Riboni, L. Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology* 7:164-170; 1971.
9. Hirschfield, A. N.; Midgley, A. R. Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biol. Reprod.* 19:597-605; 1978.
10. Meyer, C. D. Hypothalamic and raphe serotonergic systems in ovulation control. *Endocrinology* 103:1067-1074; 1978.
11. Sherwood, N. M.; Timiras, P. S. A stereotaxic atlas of the developing rat brain. Berkely: University of California Press; 1970.
12. Takeuchi, Y. Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. In: Osborne, N.; Hamon, M., eds. *Neuronal serotonin*, chap 2. New York: John Wiley & Sons; 1988:25-56.
13. Villar, M. J.; Chiocchio, S. R.; Tramezzani, J. H. Origin and termination of dorsal raphe-median eminence projection. *Brain Res* 324:165-170; 1984.
14. Vitale, M. L.; Villar, M. J.; Chiocchio, S. R.; Tramezzani, J. Dorsal raphe lesion alters the estrous cycle and the preovulatory gonadotropin release. *Neuroendocrinology* 46:252-257; 1987.

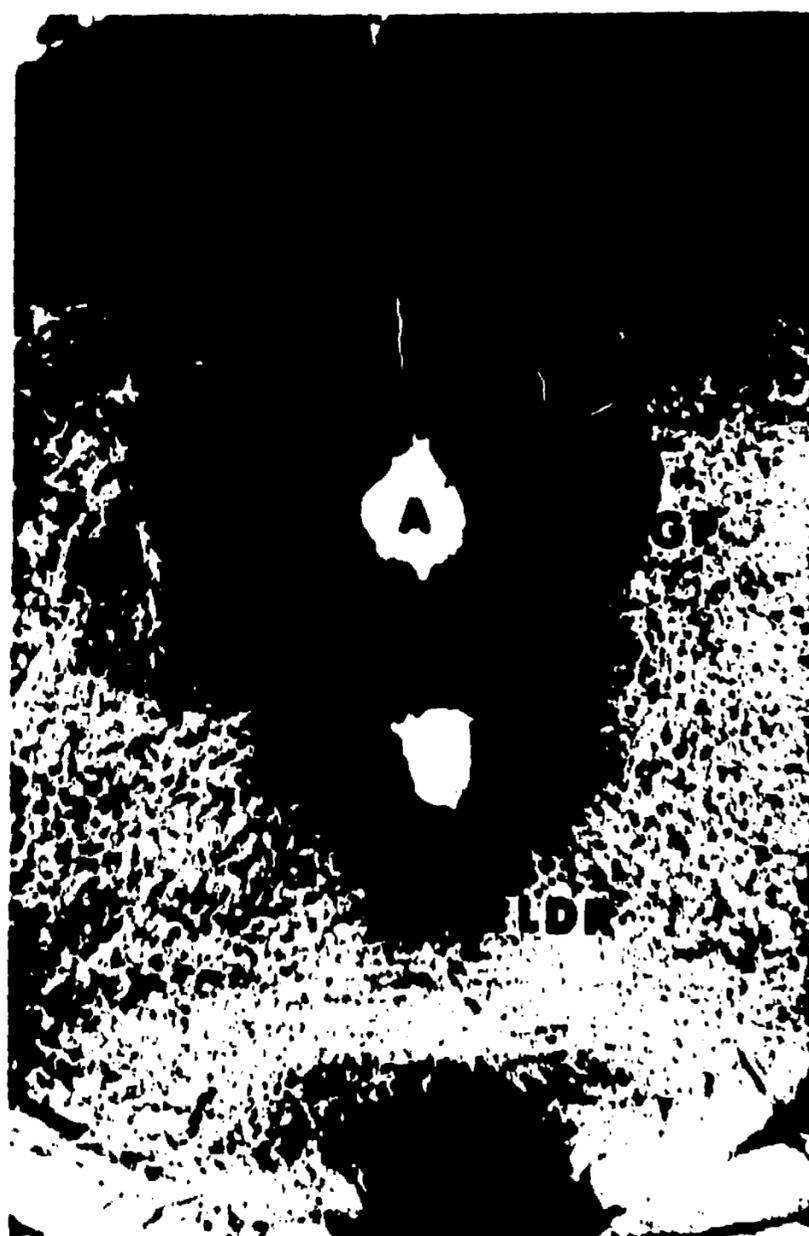


FIG. 2. Photomicrograph of a coronal section of the midbrain illustrating a complete lesion of the dorsal raphe nuclei (CLDR); SGP, substantia grisea periventricularis; A, aqueduct. 20 $\times$ .

of rats with a lesion on the right side on the DRN ( $1 \pm 0.5$  vs.  $3 \pm 1.0$ ). An increase in the number of preovulatory follicles in the ovaries of rats with a bilateral lesion on the DRN was observed ( $11 \pm 1$  vs.  $5 \pm 0.8$ ,  $p < 0.05$ ).

The administration of hCG to animals with a bilateral lesion on the DRN induced ovulation in 60% of the animals (3/5 vs. 0/8,  $p < 0.05$ ), and the number of ova shed by ovulating animals was  $7.0 \pm 0.6$ . The weight of the ovaries in hCG-treated animals was higher than in rats with bilateral lesion of the DRN, while the weight of the uterus was lower (ovaries:  $32 \pm 2.5$  mg vs.  $17.9 \pm 0.9$ , uterus:  $64 \pm 3.7$  vs.  $131 \pm 15.7$ ,  $p < 0.05$ ).

#### DISCUSSION

The results suggest that the serotonergic innervation arising from the DRN plays a stimulatory role on the mechanisms regulating puberty and first ovulation.

The delay on the onset of puberty may represent a reduction in the secretion of estrogens by the ovary, or an alteration in the neural mechanisms related to the positive feedback effects of estrogens to induce puberty, or both.

In the adult rat, the lesion of the DRN provoked the axonal degeneration of serotonergic fibers and a decrease in the concentration of serotonin in the median eminence and in luteinizing hormone (LH) plasma levels (13,14).

The results obtained in the present study support our previous statement that the presence of serotonin is essential for the occurrence of the preovulatory surge of LH (3). The absence of ovulation in rats with a bilateral lesion of this nuclei, its restoration by the administration of hCG, and the increase in the number of preovulatory follicles in the ovaries suggest the blockage of the release of LH. Such results may represent an alteration in the sensitivity of neural centers to estrogens, because the animals open vagina and the weight of the uterus was similar to control rats.

The increase in the number of ova shed by the ipsilateral ovary to a unilateral lesion on the DRN support the hypothesis of the existence of a neural connection between the central nervous system and the ovary (5,6,8). Such an increase could be the result of the excitation of a stimulatory pathway produced by the scar provoked by the lesion. Another possibility is the elimination of a neural inhibitory pathway to the ipsilateral ovary.

The difference in the number of preovulatory follicles present in the left or right ovaries of rats with a lesion on the left side of the DRN, supports the idea that the neural information arriving to each ovary is dissimilar (4,7).

To our knowledge, there is no anatomical evidence on the existence of a neural pathway from the raphe dorsal nuclei to the ovary. To explain the present results we suggest the ex-

TABLE I

THE AGE OF VAGINAL OPENING AND FIRST VAGINAL ESTROUS, NUMBER OF OVA SHED BY THE RIGHT AND LEFT OVARY, WEIGHT OF THE OVARIES, AND OVULATION RATE (NUMBER OF OVULATING ANIMALS/NUMBER OF TREATED RATS) OF RATS WITH SHAM LESION AND LESION IN LEFT SIDE, RIGHT SIDE, OR BOTH SIDES OF THE DORSAL RAPHE NUCLEI AUTOPSIED THE DAY OF FIRST VAGINAL ESTROUS

Group	n	VO	FVO	Number of Ova Shed		Weight of the Ovaries
				Left Ovary	Right Ovary	
SI	15	$42.1 \pm 0.4$	$42.7 \pm 0.5$	$4.2 \pm 0.4$	$4.5 \pm 0.4$	$30.0 \pm 1.9$
LDRN	9	$41.6 \pm 0.9$	$42.6 \pm 0.8$	$6.4 \pm 0.3^*$	$3.9 \pm 0.4$	$28.7 \pm 2.6$
RDRN	8	$43.8 \pm 0.5$	$44.9 \pm 0.6^\dagger$	$4.6 \pm 0.5$	$6.5 \pm 0.5^*$	$32.4 \pm 1.9$
BDRN	8	$44.0 \pm 0.5^\dagger$	$46.6 \pm 0.8^\dagger$	0	0	$17.9 \pm 0.9^\dagger$

Mean  $\pm$  SEM.

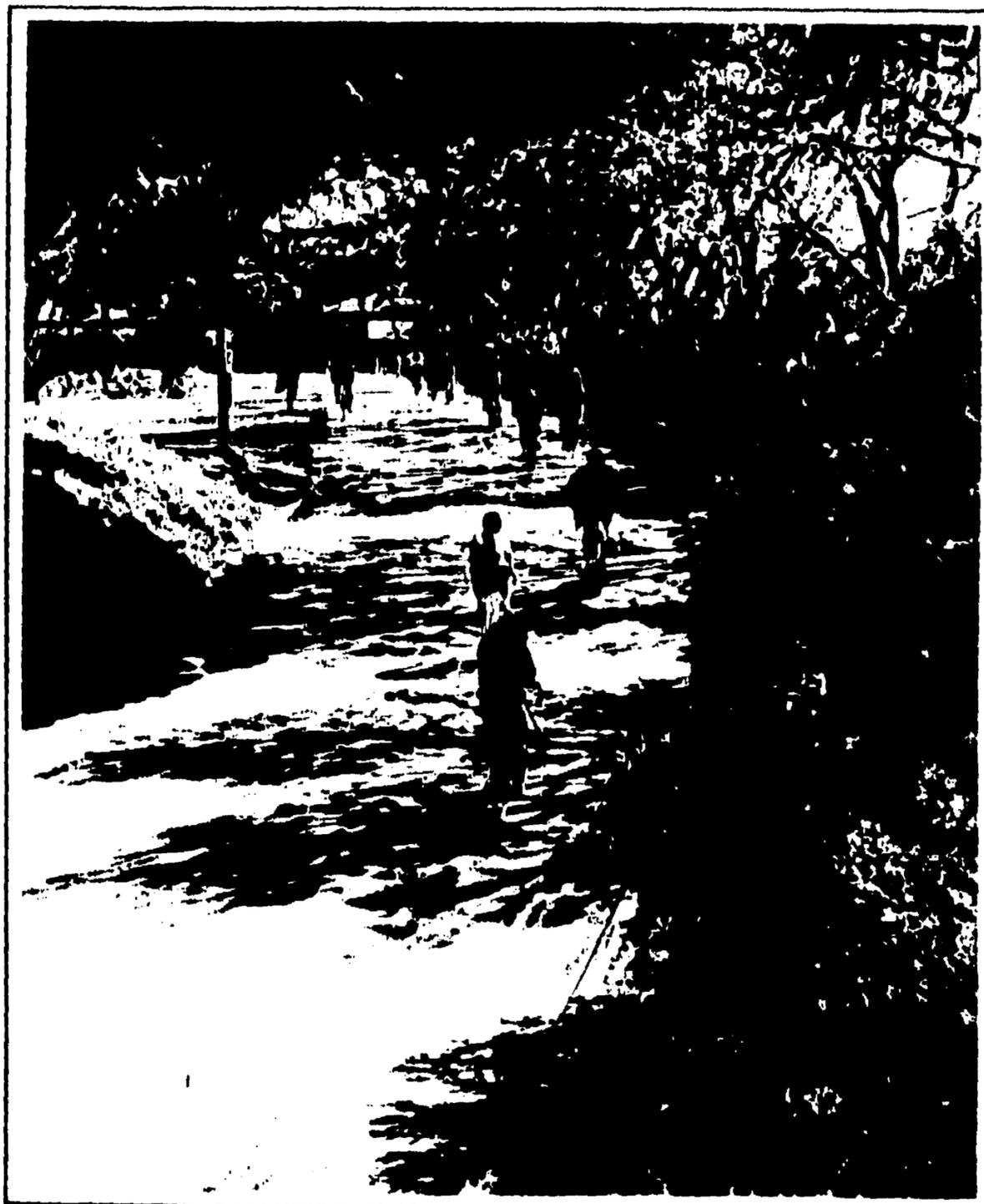
\* In comparison with sham-operated group,  $p < 0.05$  (Kruskal-Wallis followed by the Mann-Whitney U-test).

† In comparison with sham-operated group,  $p < 0.05$  (MANOVA followed by Tukey's test).

FALLA DE ORIGEN

# SOCIETY FOR THE STUDY OF REPRODUCTION

Biology of Reproduction/Volume 52/Supplement 1



*Biking to Classes*

*Photo by Editorial Design UC-D*



# SSR

JULY 9-12, 1995 28TH ANNUAL MEETING  
UNIVERSITY OF CALIFORNIA  
DAVIS, CALIFORNIA

FALLA DE ORIGEN

**313 Sex Differences in Coitus-induced Release of Hypothalamic Norepinephrine and GnRH in Rabbits as Measured by Microdialysis.**  
Shu-Ping Yang\*, K.-Y. Francis Pau, David L. Hess, and Harold G. Spies  
Division of Reproductive Sciences, Oregon Regional Primate Research Center, Beaverton, OR 97006.

Gonadotropin releasing hormone (GnRH) and luteinizing hormone (LH) secretion is activated by coitus in female rabbits, and while norepinephrine (NE) is involved in this process, the temporal sequence for NE effects is unclear. Furthermore, although increments in circulating LH and testosterone (T) after mating in male rabbits have been inconsistently observed, changes in male hypothalamic neurochemicals in association with coitus remain to be described. In experiment 1, we utilized the technique of microdialysis ( $\mu$ D) to examine simultaneous hypothalamic NE and GnRH release before, during and after mating in both male and female rabbits. Each rabbit received a femoral vein catheter and a  $\mu$ D guidetube directed toward the median eminence (ME) via a headpiece. The fluid lines were passed to another room where all samples were collected without disturbing the animals. Accumulated  $\mu$ D samples (Krebs Ringer Phosphate buffer, KRP) and intermittent blood samples were collected at 10 min intervals for 7 hours. Tethered, freely moving rabbits were exposed to their untethered partners for 10 minutes at the beginning of the 4th hour by removing a plexiglass barrier. Coitus was confirmed by the presence of sperm in the vagina. Levels of GnRH were determined by radioimmunoassay (RIA) and NE by HPLC with electrochemical detection in 50  $\mu$ l of KRP. Concentrations of plasma LH and PRL were assayed by specific RIAs. Levels of NE increased over pre-mating values within 20 min of coitus ( $430 \pm 181$  vs  $110 \pm 90$  pg/ml,  $n=3$ ,  $P<0.05$ ) in the females and remained elevated for 1-2 h. Increased levels of GnRH were also observed within 20 min of coitus ( $179.1 \pm 29.5$  vs  $4.4 \pm 3.8$  pg/ml) and GnRH levels remained elevated for 3-4 h. Concomitant surges of plasma LH and PRL were maximum within 1h (pre= $1.6 \pm 0.6$  and  $0.9 \pm 0.1$ , peak= $147.4 \pm 45.8$  and  $19.1 \pm 3.1$  ng/ml, respectively for LH and PRL,  $P<0.05$ ). No significant changes in any of the four hormones were observed in sham-mated females ( $n=6$ ). Likewise, no significant changes in the levels of hypothalamic GnRH and NE or plasma LH and PRL were observed in males after coitus or sham-mating ( $n=4$ , each). To confirm these results, Experiment 1 was repeated in males without  $\mu$ D headpieces. Levels of plasma LH, PRL, as well as T were again unchanged after coitus ( $n=4$ ) or sham-mating ( $n=6$ ) in these male rabbits. In sum, these observations support the majority of published reports, and are consistent with the concept that sexually dimorphic mechanisms regulating GnRH and LH secretion are present in the rabbit. We conclude that the hypothalamic-pituitary-gonadal axis in the two sexes of rabbits responds differently to genital stimulation, and that the release of hypothalamic NE increases prior to, or concurrent with, a GnRH surge in the female. (Supported by NIH grants RR-00163, HD-18185 and DK-30316)

**315 THERE IS NOT RELATIONSHIP BETWEEN SEROTONIN CONTENT IN THE HYPOTHALAMUS AND OVULATION, IN PREPUBERTAL RATS WITH A LESION IN THE DORSAL RAPHE NUCLEUS (DRN).**

M.E. Ayala, J. Monroy\* and R. Dominguez. Biology of Reproduction Unit, FES Zaragoza UNAM AP 9-020 CP 15,000 Mexico, D.F. Mexico.

Serotonin participates in the neuroendocrine regulation of GnRH secretion preceding ovulation. The effects of a lesion in the DRN on first ovulation, depend on the age of the animal when the lesion was done performed. To analyze if the changes in ovulation depend on the content of serotonin in the hypothalamus, serotonin and its metabolite were quantified by HPLC in rats with a lesion in the DRN was done performed on days 21, 24, 27 or 30 of age, autopsied the day of first vaginal estrus.

Table shows the results (expressed as ng/ mg of tissue):

Group	Ovulation rate	Number of ova shed	5-HT	5-HIAA
<b>21 day</b>				
Sham	7/9	8.0 $\pm$ 0.6	0.99 $\pm$ 0.11	0.94 $\pm$ 0.13
Lesion	6/12	7.0 $\pm$ 0.4	0.22 $\pm$ 0.03 *	0.87 $\pm$ 0.28
<b>24 day</b>				
Sham	13/14	7.4 $\pm$ 0.4	0.92 $\pm$ 0.09	1.19 $\pm$ 0.11
Lesion	10/12	9.7 $\pm$ 0.4 *	0.19 $\pm$ 0.01 *	1.02 $\pm$ 0.14
<b>27 day</b>				
Sham	8/13	7.7 $\pm$ 0.4	0.92 $\pm$ 0.07	0.71 $\pm$ 0.07
Lesion	10/10	9.5 $\pm$ 0.5 *	0.14 $\pm$ 0.01 *	0.63 $\pm$ 0.03
<b>30 day</b>				
Sham	12/16	7.5 $\pm$ 0.4	0.94 $\pm$ 0.03	1.99 $\pm$ 0.32
Lesion	0/14 *	0	0.13 $\pm$ 0.02 *	1.29 $\pm$ 0.10 *

\*  $P<0.05$  vs sham group.

Present results suggest that the modifications in spontaneous ovulation induced by DRN lesions, do not depend on the hypothalamic serotonin content.

Supported by PADBP, DGAPA IN 210893, CONACyT N1719 and PUIS.

**314 PATTERNS OF GONADOTROPIN, LH AND FSH DURING DOPAMINE AGONIST INDUCED TERMINATION OF ANESTRUS IN BEAGLE DOGS.**  
E. Oulic, M. Versteegen, L.D.M. Silva, and P. Concannon?  
Faculty of Veterinary Medicine, University of Liege, Liege, Belgium and College of Veterinary Medicine, Cornell University, Ithaca, NY.

Administration of a dopamine agonist during the obligate anestrus of ovarian cycles in dogs results in early termination of anestrus, a proestrus follicular phase and fertile ovulation. Three groups of dogs each were administered the dopamine agonist cabergoline (5 ng/kg/day) until proestrus or for 60 days beginning in early (mean cycle day 106), mid (day 142) or late (day 178) anestrus. LH, FSH and prolactin were assayed in plasma obtained every 1-3 days. The resulting interestrus intervals were 111 $\pm$ 11, 166 $\pm$ 15, and 188 $\pm$ 5 days, respectively, and shorter or less variable ( $P<0.05$ ) than the 196 $\pm$ 24 days in 5 control bitches. The duration of treatment until proestrus was 20 $\pm$ 5, 10 $\pm$ 5 and 6 $\pm$ 2 days in the early, mid, and late anestrus dogs, respectively. In each group prolactin was reduced from values at 75 days post estrus ( $5.8 \pm 1.0$ ) but detectable ( $2.8 \pm 0.4$  ng/ml) before the start of treatment, was decreased to non-detectable ( $<0.5$  ng/ml) or near-nondetectable levels within 2-5 days, and remained low throughout treatment. FSH was elevated at normal anestrus levels ( $185 \pm 20$  ng/ml) pre-treatment, remained high until proestrus in all early and mid-anestrus bitches, but was decreased within 2-3 days ( $77 \pm 15$  ng/ml) in all late anestrus bitches, at or just before signs of induced proestrus. FSH reached nadir ( $<5$ ) in late proestrus, 2-4 days before increasing to ovulatory peak levels ( $260 \pm 26$ ). LH was low pre-treatment ( $0.3 \pm 0.2$ ), increased transiently to  $4.2 \pm 0.8$  at day 3-5 in 10 of 15 dogs, and was then reduced until the ovulatory LH surge ( $19.5 \pm 1.5$ ). The data demonstrate that prolactin-lowering doses of dopamine agonist can transiently elevate LH rapidly in early or late anestrus, but alter ovarian function sufficient to cause negative feedback on FSH secretion more rapidly in late than early anestrus. Therefore, changes other than reduced prolactin and LH elevation, and related to stage of cycle, must be required for the follicular response of dogs to dopamine agonist treatment.

**316 ASYMMETRY IN THE ABILITY OF A UNILATERAL IMPLANT OF HALOPERIDOL (HLP) INTO THE PREOPTIC-ANTERIOR HYPOTHALAMIC AREA (POA-AHA), PERFORMED ON ESTRUS DAY, TO MODIFY SPONTANEOUS OVULATION OF THE RAT.**

J. L. Morán\*, Reproduction Research Unit, FES-Zaragoza, UNAM, AP9-020, CP15000, Mexico City.

The participation of the cholinergic system of POA-AHA in the regulation of ovulation on the day of estrus (E) is asymmetric and lateralized, while there is evidence that the participation of the dopaminergic system of POA-AHA is not. The unilateral implant of 10.0 $\pm$ 3.0  $\mu$ g of HLP in the right (R) or left (L) side of POA-AHA blocked ovulation when was done the day of E. To analyze if a lower dose of HLP does not hide the asymmetric response on E, at 13:00 h of E, cyclic 4-day rats were implanted with cholesterol (CHOL), HLP, or a 1:1 mixture of cholesterol and HLP (MIX), into the R or L side of POA-AHA and autopsied on the next expected day of E. Some animals with an implant of the mixture into the right side were injected at 13:00 h with GnRH on the expected day of proestrus, or with estradiol benzoate (EB) on diestrus-2. Results are shown in the table:

Implant	Ovulation rate	Number of ova shed
CHOL-R-L	14/30	11 9 $\pm$ 0.8
HLP-R-L	1/21 *	12
MIX-R	0/8 *	0
MIX-L	5/8	10 2 $\pm$ 0.6
MIX-R+GnRH	5/6	9 2 $\pm$ 1.3
MIX-R+EB	0/4 *	0

\*  $P<0.05$  compared with CHOL-R-L and MIX-L.

Present results suggest that the dopaminergic system of POA-AHA plays an asymmetric role in the neuroendocrine mechanisms regulating the ovulation and the sensibility of the right side to blockade is higher than the left one.

[Supported by CONACyT and DGAPA IN 210893]