

00387

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO



POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

UN ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA
INERVACIÓN SEROTONINÉRGICA QUE SE ORIGINA EN
EL NÚCLEO DORSAL Y MEDIAL DEL RAFÉ EN LA
REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LAS
GONADOTROPINAS Y EN EL INICIO DE LA PUBERTAD.
LA RATA HEMBRA COMO MODELO DE ESTUDIO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

DOCTORA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

P R E S E N T A

JUANA MONROY MORENO

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

MÉXICO, D.F.

OCTUBRE, 2004

COORDINACIÓN

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 esta 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
AUTÓNOMA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

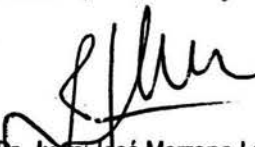
Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 24 de mayo del 2004, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna JUANA MONROY MORENO con número de cuenta 86157885 y número de expediente 500962015, con la tesis titulada: "UN ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN SEROTINÉRGICA QUE SE ORIGINA EN EL NÚCLEO DORSAL Y MEDIAL DEL RAFÉ EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LAS GONADOTROPINAS Y EN EL INICIO DE LA PUBERTAD. LA RATA HEMBRA COMO MODELO DE ESTUDIO", bajo la dirección del DR. Roberto Domínguez Casalá.

Presidente:	Dr. Benjamín Florán Garduño
Vocal:	Dra. María Elena Ayala Escobar
Vocal:	Dra. María Eugenia Mendoza Garrido
Vocal:	Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura
Secretario:	Dr. Roberto Domínguez Casalá
Suplente:	Dra. María Esther Cruz Beltrán
Suplente:	Dr. Alejandro Daniel Domínguez González

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 7 de julio del 2004.


Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

RECONOCIMIENTOS

Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero otorgado en la beca de doctorado.

Dirección General de Estudios de Posgrado por el apoyo financiero otorgado en la beca complementaria de doctorado.

Durante el desarrollo de la tesis se contó con el apoyo financiero de la **Dirección General de Asuntos del Personal Académico**, proyecto **IN 210500**

A los miembros del Comité Tutotal

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dr. Benjamín Floran Garduño

Dr. Enrique Pedernera Asteguiano

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su dirección y ayuda en la realización de la tesis.

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá por todo el apoyo que me brindo en la elaboración de esta tesis.

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dr. Benjamín Floran Garduño

Dra. María Eugenia Mendoza Garrido

Dr. Pablo Gustavo Damián Matsumura

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dr. Alejandro Daniel Domínguez González

Por su valiosa contribución en la elaboración de esta tesis.

A la Técnico Maria Luisa Illescas por su colaboración técnica en el estudio histológico.

A la Dra. María Eugenia Mendoza Garrido, del departamento de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN y al Dr. Pablo Damián Matsumura del departamento de Biología de la Reproducción de la UAM-Iztapala, por su ayuda en la implementación de la técnica de radioinmunoanálisis.

Al Biol. Roberto Chavira, del laboratorio de hormonas esteroides del INCMN "Salvador Zubirán" por su colaboración en la realización de la técnica de radioinmunoanálisis.

A Eloir, Miriam, Selene, Victoria, Sergio, Julio, Abel y Juan Luis, por crear un inmejorable ambiente de trabajo en el laboratorio de Pubertad.

A todos los integrantes de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

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

Dedicatorias

*A mis padres, María y Raymundo
por darme todo su amor*

*A mis hermanas y hermanos
por estar conmigo y saber que cuento
con ellos incondicionalmente*

*A mis sobrinos
porque con sus sonrisas puedo
soñar con un mundo mejor*

*A Eloir porque su amistad permite
hacer fácil lo difícil*

A Miriam gracias por su amistad

*A Cesar, Marta, Lorena y
Carolina porque siempre pienso en
ellos*

ÍNDICE

	Páginas
Resumen	i
Summary	iv
Introducción	1
Organización del sistema GnRHérgico	8
Organización del sistema serotoninérgico	12
Participación de los núcleos del rafé en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación	20
Justificación	25
Hipótesis	27
Objetivo general	27
Objetivos particulares	28
Materiales y método	29
Resultados	36
Experimento 1. Estudio de los efectos de la lesión del núcleo dorsal del rafé, sobre secreción de las gonadotropinas y esteroides, y en el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico durante la etapa peripuberal de la rata	36
Experimento 2. Estudio de los efectos de la administración de antagonistas o agonistas del sistema noradrenérgico en animales con lesión del núcleo dorsal del rafé, sobre el inicio de la pubertad y la primera ovulación	50
Experimento 3. Estudio de los efectos de la estimulación química del sistema serotoninérgico del núcleo medial del rafé sobre la secreción de las gonadotropinas	68

Discusión	80
Conclusiones	95
Perspectivas	97
Referencias	99
Publicaciones	116

RESUMEN

La inervación serotoninérgica del hipotálamo se origina de los núcleos dorsal y medial del rafe. Se acepta que la secreción de las gonadotropinas y las funciones del ovario son reguladas por el sistema serotoninérgico. Se ha mostrado que la lesión química del núcleo dorsal del rafe (NDR) bloquea la primera ovulación e incrementa el porcentaje de atresia y la eliminación del núcleo medial (NMR) no modifica dichos parámetros. Es posible la lesión del NDR modifique la secreción de las gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH)] en los días previos al inicio de la pubertad, por ello en el presente estudio se analizaron los efectos de la eliminación de la información serotoninérgica del NDR en los días previos a la primera ovulación sobre la concentración en suero de FSH, LH, progesterona (P_4) y 17β -estradiol (E_2) y en el crecimiento y maduración del folículo ovárico, y en la concentración de serotonina (5-HT) y ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo anterior (HA), medio (HM) y posterior (HP). Es probable que la lesión del NDR modifique al sistema noradrenérgico por ello, se analizaron los efectos del bloqueo o la estimulación del sistema noradrenérgico en animales con lesión del NDR sobre en el inicio de la pubertad y la primera ovulación. Así mismo, se estudiaron los efectos de la estimulación del NMR por medio de la microinyección en el núcleo de 5-hidroxitriptofano, en las concentraciones de gonadotropinas, P_4 y E_2 y en la actividad del sistema serotoninérgico ($[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$).

En los animales con lesión del NDR, la concentración de P_4 aumentó dos días después de la lesión y disminuyó en los animales sacrificados a los ocho y doce días después de la lesión. En los animales sacrificados a los cuatro días la concentración de E_2 fue mayor y menor a los diez y doce días. La concentración de FSH y LH no se

modificó, excepto en los animales sacrificados en el día cuatro post-lesión, donde la concentración de LH fue menor y en aquellos sacrificados en el día seis, en los que la concentración de FSH fue mayor. En los ovarios de los animales con lesión del NDR, el número total de folículos medidos disminuyó en los animales sacrificados a los ocho y diez días, mientras que a los doce aumentó y la incidencia de atresia fue mayor en los folículos medianos y preovulatorios en todas las edades estudiadas. La concentración de 5-HT y 5-HIAA disminuyó significativamente en las tres áreas hipotalámicas estudiadas.

El tratamiento con propranolol (antagonista de los receptores β -adrenérgicos) en los animales con lesión del NDR restableció la ovulación en el 73 % de los animales y la concentración de P_4 se incrementó.

En los animales con lesión química y tratados con isoproterenol (agonista de los receptores β -adrenérgicos) se restableció la ovulación en el 50% y fue mayor la concentración en suero de P_4 y E_2 . La actividad de la neurona serotoninérgica en HA, HM y HP fue similar a los animales con lesión.

En los animales con microinyección de 5-HTP en el NMR la concentración de 5-HT y 5-HIAA en el HA de los animales sacrificados 120 minutos fue mayor. En el HP la concentración de 5-HIAA y la relación $[5-HIAA]/[5-HT]$ aumentó en los animales sacrificados 60 o 90 minutos después de la estimulación, y la concentración de FSH y P_4 se incrementó a los 60 minutos después de la estimulación, mientras que a los 90 minutos la concentración de P_4 y E_2 fue menor.

En conjunto, estos resultados muestran que el sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo dorsal del rafe regula de manera estimulante las funciones del ovario y así como la secreción de las gonadotropinas por medio del sistema noradrenérgico. Mientras que el núcleo medial participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de la FSH.

SUMMARY

The serotonergic innervation of the hypothalamus arises in the dorsal (DRN) and medial (MRN) raphe nucleus, and participates in the regulation of gonadotropins secretion and ovarian functions. The lesion of the DRN resulted in the blockade of first ovulation and increased the percentage of follicular atresia in the ovaries, while the lesion of MRN did not result in modifications in both parameters. Such results are interpreted as an indication that the lesion of DRN resulted in the blockade of gonadotropins secretion [follicle stimulating hormone (FSH) and luteinizing hormone (LH)], in the days previous to puberty. This possibility was analyzed by studying the effects caused by destroying the destruction of the serotonergic neurons of the DRN by the microinjection of 5,6-dihydrotryptamine, on gonadotropins and ovarian steroids serum levels, follicular growth and monoamines levels in the anterior (HA), medium (HM) and posterior (HP) hypothalamus 2, 4, 6, 8, 10 or 12 days after the lesion. Because the effects of the DRN lesion have been explained as the result of modifications in the noradrenergic system, we also analyzed the effects of the treatment with propranolol (β -adrenal receptor blocking drug) or isoproterenol (β -adrenal receptor stimulatory drug), in rats with a lesion in the DRN on spontaneous ovulation. We also analyzed the effects of the stimulation of the MRN by the microinjection of the 5-hydroxytryptophane, on serum levels gonadotropins, and changes in serotonergic activity in the hypothalamus.

Compared to control animals, two days after the lesion to the DRN a significant rise in progesterone (P_4) serum levels was observed, which was followed by a drop on days 8 and 12. The 17β -estradiol (E_2) serum concentration increased on

the fourth day after treatment, and decreased significantly on days 10 and 12. Compared to sham-operated animals, animals with a lesion to the DRN showed a significant increase in the number of follicular atresia in the ovaries. Four days after treatment, 5-HT levels in the anterior and medial hypothalamus decreased significantly; while in the posterior hypothalamus, such decrease was observed since day two.

The injection of propranolol to rats with a lesion to the DRN restored ovulation in 73% of the treated animals, and the P^4 serum level was similar to control animals. In these animals the serotonergic activity in the HA was lower than control group, while in the HM it was similar to the sham-operated group.

The injection of isoproterenol to rats with a lesion on the DRN restored ovulation in 50 % of the treated animals. The P_4 and E_2 serum levels were higher than in rats with the DRN lesion. In comparison with rats with a lesion in the DRN, significant differences in the activity serotonergic in HA, HM and HP were not observed.

The stimulation of the MRN by tryptophan resulted in a significant increased in the serum concentration of FSH and a decrease in LH. The concentration of P_4 was consistently higher 60 minutes after stimulation, while the P_4 and E_2 serum levels were lower than in control animals 90 minutes after the stimulation. In HA the serotonin and 5-HIAA concentrations increased 90 minutes after stimulation and in the posterior hypothalamus the 5-HIAA concentration and relation $[5\text{-HIAA}]/[5\text{-HT}]$ were higher than in controls.

The results presented herein suggest that during the pre-pubertal period the serotonergic innervation from the DRN has a stimulatory influence on gonadotropin regulation and first ovulation. Also, such innervation plays a role controlling ovarian hormonal secretion and follicular growth. The noradrenergic innervation exerts an indirect influence on the same parameters. On the other hand, the MRN seems to have a stimulatory role on the regulation of FSH secretion.

INTRODUCCIÓN

La pubertad se define como la etapa biológica que une la inmadurez y la madurez sexual, en la que se llevan a cabo una serie de cambios neuroendocrinos y fenotípicos que marcan el inicio de la actividad reproductiva. Dichos cambios ocurren durante el desarrollo postnatal del animal y la ontogenia de dicho proceso está determinada genéticamente para cada individuo. Existen otros factores como la nutrición, los estímulos sociales y factores ambientales que influyen en dicho proceso (Adams y Steiner 1988).

En la hembra de los roedores la señal externa que pone en evidencia el inicio de la pubertad es el rompimiento del epitelio que cubre la vagina (apertura vaginal). En la rata, este evento ocurre entre los 35 y 45 días después del nacimiento. El epitelio vaginal en ese momento presenta características de proestro o estro y la primera ovulación se puede presentar alrededor de las 24 o 48 horas posteriores a la canalización vaginal (Ojeda y Urbanski, 1994).

La pubertad está regulada por diversos mecanismos neuroendócrinos en los que participan las gónadas, el hipotálamo que secreta la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) y la hipófisis que produce las gonadotropinas [hormona folículo estimulante (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés)] (Fink, 1988).

En la rata, el desarrollo de los mecanismos involucrados en el control del inicio de la función reproductiva se produce en un lapso de cinco semanas, en el que el peso corporal aumenta quince veces y la longitud del cuerpo tres veces (Becú-

Villalobos y Lacau-Menguído, 1990). En función de una serie de cambios morfológicos y fisiológicos relacionados con los distintos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Ojeda y col., (1986) clasifican el desarrollo postnatal de la rata en cuatro etapas: neonatal, infantil, juvenil y peripuberal.

Etapa neonatal: Se inicia con el nacimiento y dura hasta el día siete de vida. En esta etapa el ovario se caracteriza por ser insensible a las gonadotropinas. Esto se debe a que los receptores a la FSH y LH recién se expresan a partir del día cuatro, por lo que se sugiere que el inicio del crecimiento folicular es independiente de los efectos de la gonadotropinas. A partir del día cinco de edad la concentración de FSH en el plasma comienza a incrementarse. En el ovario, la FSH estimula la síntesis de la enzima aromatasa y como consecuencia la producción de estrógenos a partir de la testosterona (Ojeda y col., 1986).

En esta etapa el control de retroalimentación inhibitoria que ejercen los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas es ineficiente debido a que en el plasma existe una alta concentración de α -fetoproteína, la que se une fuertemente a los estrógenos impidiendo que estos actúen en el hipotálamo y la hipófisis y se cierre el circuito de control inhibitorio (Nunez y col., 1971; Ojeda y col., 1986).

Al final de esta etapa, la concentración plasmática de la FSH continúa incrementándose, la LH se mantiene baja y la concentración de estrógenos aumenta debido al estímulo de la FSH sobre el ovario (Ojeda y Urbanski, 1994).

Etapa infantil: Se extiende del día ocho al día 21 de vida. Durante esta etapa en el eje hipotálamo-hipófisis ocurre una serie de cambios fisiológicos que influyen directamente en el inicio de la pubertad.

La secreción de FSH se incrementa gradualmente alcanzando un máximo en el día 12 de vida y la concentración plasmática empieza a descender cerca del día 14 y se mantiene baja hasta que se produce el primer "pico" preovulatorio de las gonadotropinas que antecede a la ovulación. En cambio, la concentración de la LH se mantiene baja y presenta pulsos de secreción durante la tarde. A partir del día 15 de vida desaparecen los pulsos de LH y comienza a detectarse inhibina en el suero (Ojeda y Ramírez, 1972; Dölher y Wuttke, 1975; Ojeda y Urbanski, 1994).

Además de los cambios observados en la secreción de las gonadotropinas, al día 16 de edad el número de receptores a FSH en la gónada alcanza valores semejantes a los del animal adulto y se inicia la expresión de los sitios de unión a la LH en las células de la teca, los cuales continúan en aumento después del día 20. Las concentraciones plasmáticas elevadas de FSH en esta etapa son fundamentales para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a ser ovulados en la pubertad (Ojeda y col., 1986).

En el día 16 de vida aumenta la concentración de estrógenos libres en el plasma debido a la disminución de la concentración sérica de la α -fetoproteína. Este hecho marca el inicio del control de retroalimentación inhibitorio que ejerce los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas, lo que permite explicar la disminución de la secreción de FSH después del día 12 de vida (Germain y col., 1978; Andrews y Ojeda, 1981(a); Ojeda y col., 1986).

Etapa Juvenil. Inicia en el día 22 y finaliza alrededor del día 30 ó 32. En esta etapa la concentración plasmática de FSH disminuye considerablemente, la de LH es baja, mientras que aumenta la de estrógenos (Ojeda y col., 1986).

La secreción de LH es de forma pulsátil y al final de esta etapa se incrementa la frecuencia y amplitud de sus pulsos durante la tarde y se establece un ritmo de secreción circadiano. Los cambios en el patrón de la liberación de la LH son fundamentales para la producción de esteroides por el ovario (Andrews y Ojeda, 1981(b); Ojeda y col., 1990).

En los ovarios se presentan ondas de crecimiento y atresia folicular, se incrementa el número de receptores a LH lo que, aunado al incremento en la secreción pulsátil de la LH, resulta en el aumento de la secreción estrógenos. Los estrógenos estimulan la liberación de LH, lo que permite afirmar que en esta fase el eje hipotálamo-hipófisis-ovario ya es funcional (Richards, 1980; Urbanski y Ojeda, 1985).

Etapa Peripuberal. Su duración es variable y finaliza con la primera ovulación. Esta etapa se caracteriza por la maduración final del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Los cambios diurnos en el patrón de secreción de las gonadotropinas se hacen evidentes. El número de receptores a las gonadotropinas en el ovario es máximo, lo que se traduce en el incremento en la secreción de progesterona, testosterona y estradiol, siendo esta última hormona responsable del rompimiento del epitelio que cubre a la vagina (apertura vaginal). El establecimiento de los pulsos de secreción de la LH y el incremento en la amplitud de los mismos estimula la producción de estradiol en el ovario. Cuando se presenta el incremento en la concentración

plasmática de estradiol similar a lo observado en la tarde del proestro en el animal adulto, se produce un aumento en la frecuencia y amplitud de los pulsos de GnRH, lo que da lugar al aumento brusco y de corta duración de la concentración plasmática de FSH y LH ("pico preovulatorio") que inducen la maduración final del folículo y culmina con la liberación del ovocito (Figura 1) (Ojeda y col., 1986; Ojeda y Urbanski, 1994).

Además de las hormonas antes mencionadas, las funciones del ovario son reguladas por sistemas diferentes de neurotransmisión: catecolaminérgico, colinérgico y péptidos, que transcurren por medio de la información neural que llega a las gónadas. El ovario de los mamíferos recibe dos tipos de inervación simpática (catecolaminérgica y peptidérgica) y parasimpática (peptidérgica y colinérgica) (Burden, 1978; Dissen y col., 1993). Las fibras nerviosas simpáticas provienen del plexo ovárico, se originan de los plexos aórtico y renal, cuyos cuerpos neuronales preganglionares provienen de los segmentos T10 y T11 de la médula espinal (Burden, 1985) y del nervio ovárico superior, que es una rama del plexo celíaco, cuyos cuerpos neuronales se localizan en los segmentos T2 y L2 del ganglio de la raíz dorsal y de los segmentos T10 a L3 del ganglio paravertebral (Klein y Burden, 1988; Lawrence y Burden, 1980).

Por el plexo ovárico transcurren fibras de neuronas que sintetizan sustancia P (SP), el péptido relacionado con la calcitonina y noradrenalina. En cambio, el nervio ovárico superior es considerado como la vía de mayor aporte de fibras noradrenérgicas al ovario y también se encuentran fibras que poseen el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el neuropéptido Y (Anesetti y col., 2001; D'Albora y col., 2000; Dessen y col., 2000).

Se ha mostrado que las fibras que contienen SP están relacionadas con la regulación del flujo sanguíneo en el ovario (Krishna y col., 2000) y participan en la modulación de la diferenciación inicial de los folículos primordiales, facilitando el paso de folículo primordial a folículo primario (Schultea y col., 1992).

La inervación parasimpática es aportada por el nervio vago (Burden, 1978) y según algunos autores por el plexo hipogástrico (Lawrence y Burden, 1980). El nervio vago, décimo par craneal, es un nervio mixto que posee fibras motoras y sensitivas (Davis y col., 2004), que se origina en tres núcleos situados en el bulbo raquídeo: el núcleo del fascículo solitario, el motor dorsal del nervio vago y el núcleo salival inferior (Burden, 1978). Por el nervio vago transcurren fibras que contienen somatostatina, SP, gastrina, VIP, colecistoquinina, metionina-enkefalina y acetilcolina (Burden y Lawrence, 1978; MacLean y Lewis 1984). Además, dicho nervio es considerado como una de las vías utilizadas por el sistema nervioso central para recibir o enviar información del ovario (Gerendai y Halász, 1997; Gerendai y col., 2000; Gerendai y col., 2002; Gerendai y col., 1998).

En la rata adulta, la sección bilateral de los nervios vago resulta en un incremento de la ovulación espontánea, mientras que la sección izquierda disminuye la proporción de animales ovulantes y la sección derecha no induce cambios. La sección bilateral disminuye la respuesta del ovario (número de ovocitos liberados) a la inyección de FSH y LH. La inervación vagal modula de manera inhibitoria la respuesta del ovario a las gonadotropinas, y al parecer en la regulación de la ovulación las fibras nerviosas que llegan al ovario izquierdo son más importante que la que llega al derecho (Cruz y col., 1986).

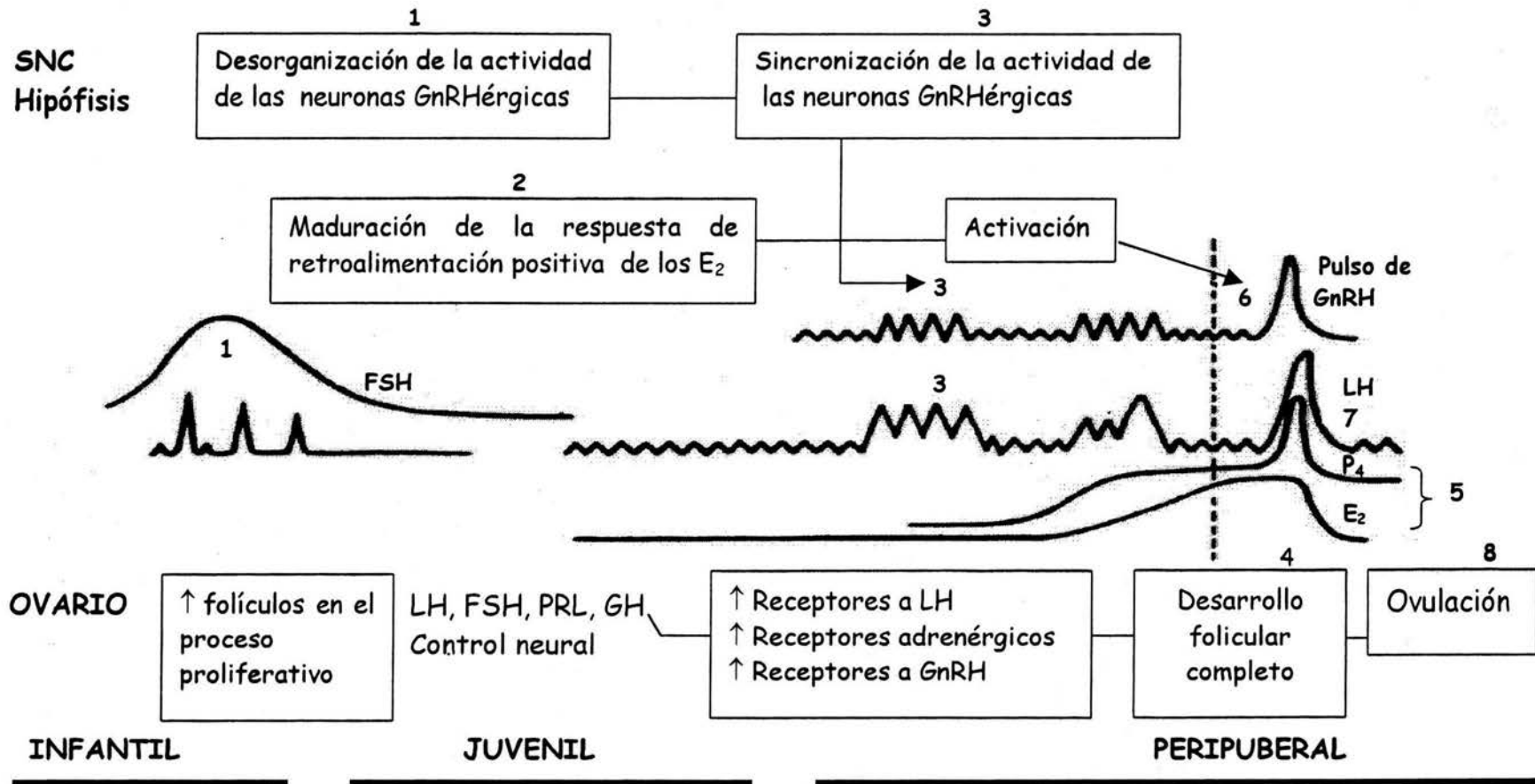


FIGURA 1. Eventos que se presentan en el sistema nervios central, la hipófisis y los ovarios previo al pico preovulatorio de las gonadotropinas en la rata hembra prepúber. Los números indican la secuencia en la que se producen estos eventos. La línea punteada representa las 12:00 h del primer proestro. SNC, sistema nervioso central; GnRH, hormona liberadora de las gonadotropinas; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del folículo; PRL, prolactina; GH, hormona de crecimiento; E₂, estrógenos; P₄, progesterona. (Tomado de Ojeda y Urbanski, 1994).

Organización del sistema GnRHérgico

La GnRH es producida por neuronas especializadas las que se localizan en los núcleos preóptico medial, anterior y arcuato, el septo y la estría terminal y forman redes laxas y dispersas,. La población de neuronas productoras de la GnRH es relativamente limitada entre 1,000 a 3,000 en todo el SNC. Las neuronas GnRHérgicas que participan en la regulación de la secreción de las gonadotropinas se distribuyen en la banda diagonal de Broca, área preóptica, área hipotalámica anterior, el núcleo arcuato y en la eminencia media, y proyectan sus axones hacia la eminencia media por las vía septo-preóptico infundibular y septo preóptico. Las neuronas localizadas en el área septal-preóptica proyectan sus axones por el fascículo retroflexo hacia áreas extrahipotalámicas como la amígdala, el área tegmental ventral, el cerebro medio, el rafé y la región periacueductal (Figura 2) (Silverman y col., 1994).

Las neuronas GnRHérgicas se originan en el epitelio olfatorio. En la rata estas células están presente desde el día 10 de vida fetal y durante los días 13 al 17, dichas neuronas migran por el septum nasal y continúan hasta llegar al cerebro anterior y al hipotálamo. El desarrollo de la neurona GnRHérgica del área hipotalámica anterior y del hipotálamo medio basal culmina alrededor de la cuarta y quinta semana del desarrollo prepuberal y es en este momento que el crecimiento dendrítico de la neurona es completo. Es posible que el proceso de diferenciación de la neurona GnRHérgica esté asociado al establecimiento de las conexiones sináptica con los diferentes sistemas de neurotransmisión (Wray y Hoffman, 1985).

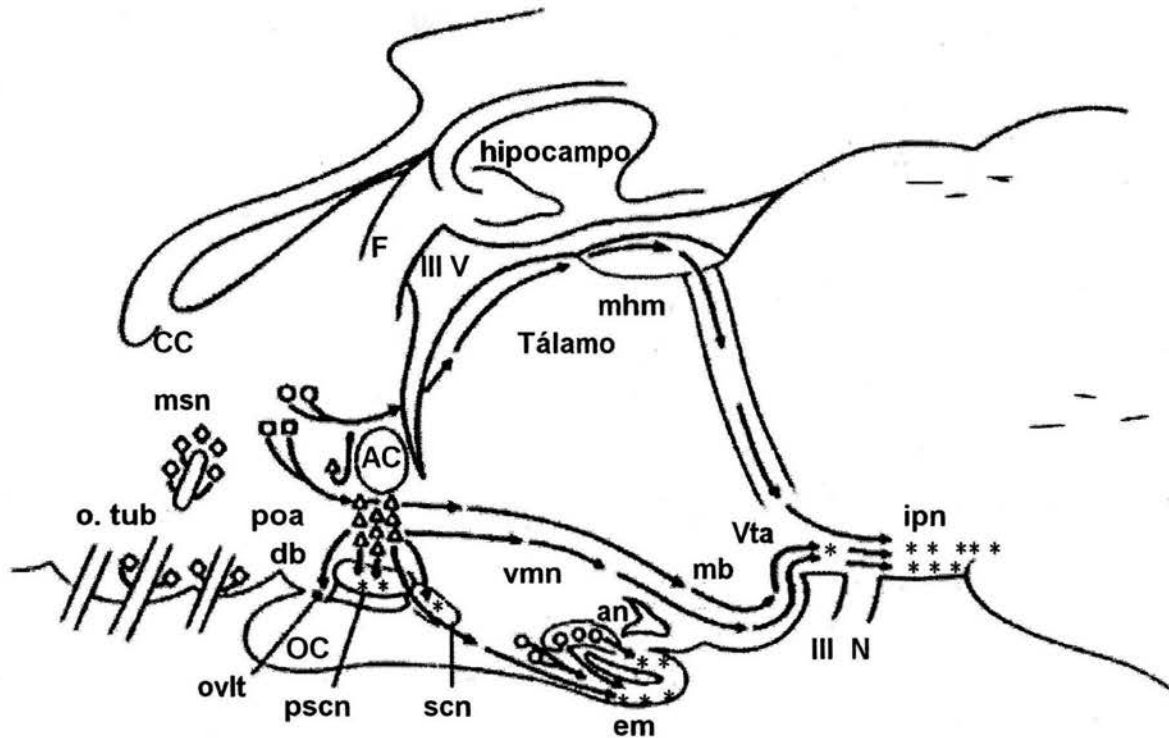


Figura 2. Esquema de un corte sagital de cerebro del cobayo, donde se muestran los diferentes núcleos y la ubicación de las neuronas GnRHérgicas se indica con símbolos geométricos; AC, comisura anterior; an, núcleo arcuato; db, banda diagonal de Broca; CC, cuerpo calloso; em, eminencia media; F, fornix; ipn, núcleo interpeduncular; mb, cuerpo mamilar; mhn, habenula media; msn, septum medial; OC, quiasma óptico; o. tub, tuberculo olfatorio; ovlt, órgano vascular de la lamina terminal; poa, área preóptica; pscn, núcleo supraquiasmático preóptico; scn, núcleo supraquiasmático; vmn, núcleo ventromedial; vta, área tegmental ventral; III V, tercer ventrículo; III N, nervio oculomotor (Tomado de Silverman y col., 1994).

La GnRH es un decapeptido que deriva de la prostraducción de una gran molécula precursora, la pre-pro-GnRH. Esta molécula consiste de 92 aminoácidos y está dividida en tres regiones: el péptido señal de 23 aminoácidos, seguido de la secuencia que dá origen al decapeptido, seguido de la secuencia Gly-Lys-Arg en las posiciones 11 a 13. El último residuo es de 56 aminoácidos, es llamado péptido asociado a GnRH (GAP). La preproGnRH se internaliza en el retículo endoplásmico, y

el péptido señal es cortado por acción de la endoproteasa PC2, dando origen a la pro-GnRH, que se transfiere al aparato de Golgi, donde se da la ruptura de la cadena por la reacción proteolítica que elimina dos aminoácidos básicos, Lys-Arg separando así a GnRH de la GAP. La GnRH es activada mediante la ciclización enzimática de la glutamina N-terminal, la ruptura del enlace gly¹¹-gly¹⁰ y la amidación de la glicina en el carbono terminal (Busby y col., 1987; Charli y col., 1991; Seeburg y col., 1987). Posteriormente, la GnRH y la GAP son almacenados en vesículas de secreción, que son transportadas desde el soma a la terminal nerviosa que llega a la eminencia media por transporte axonal (Ronnekleiv y col., 1987, 1989; Seeburg y col., 1987). En la eminencia media la GnRH es liberada por exocitosis en respuesta a un cambio en el potencial de membrana que permite la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, el incremento en la entrada de calcio extracelular permite que las vesículas de secreción se fusionen con la membrana plasmática y se libera el decapeptido. La liberación de la GnRH es en pulsos con una frecuencia y una amplitud propia de cada especie y del momento del ciclo estral. La GnRH es transportada por el sistema portal-hipotálamico-hipofisiario hasta los gonadotropos localizados en la adenohipófisis donde estimula la secreción de la FSH y LH (Figura 3) (Charli y col., 1991; Yen, 2003).

La secreción de GnRH por las células hipotálamicas es regulada por un doble control, hormonal y nervioso. El control hormonal se realiza por mecanismos de retroalimentación inhibitorios y estimulatorios largos, cortos y ultracortos (Conn, 1994). El control neural comprende la regulación de la actividad de la neurona GnRHérgica por otras regiones del SNC (corteza, sistema límbico, núcleo del rafé, etc.) vía la liberación de diferentes neurotransmisores como noradrenalina, dopamina, serotonina, ácido γ -aminobutírico (GABA), péptidos opioides y aminoácidos

excitadores como glutamato y aspartato (Kordon y col., 1994). Esto se logra por la interacción sináptica entre los axones de los diferentes sistemas de neurotransmisión y el soma o las fibras nerviosas de la neurona productora de la GnRH (Jennes y col., 1982, 1983).

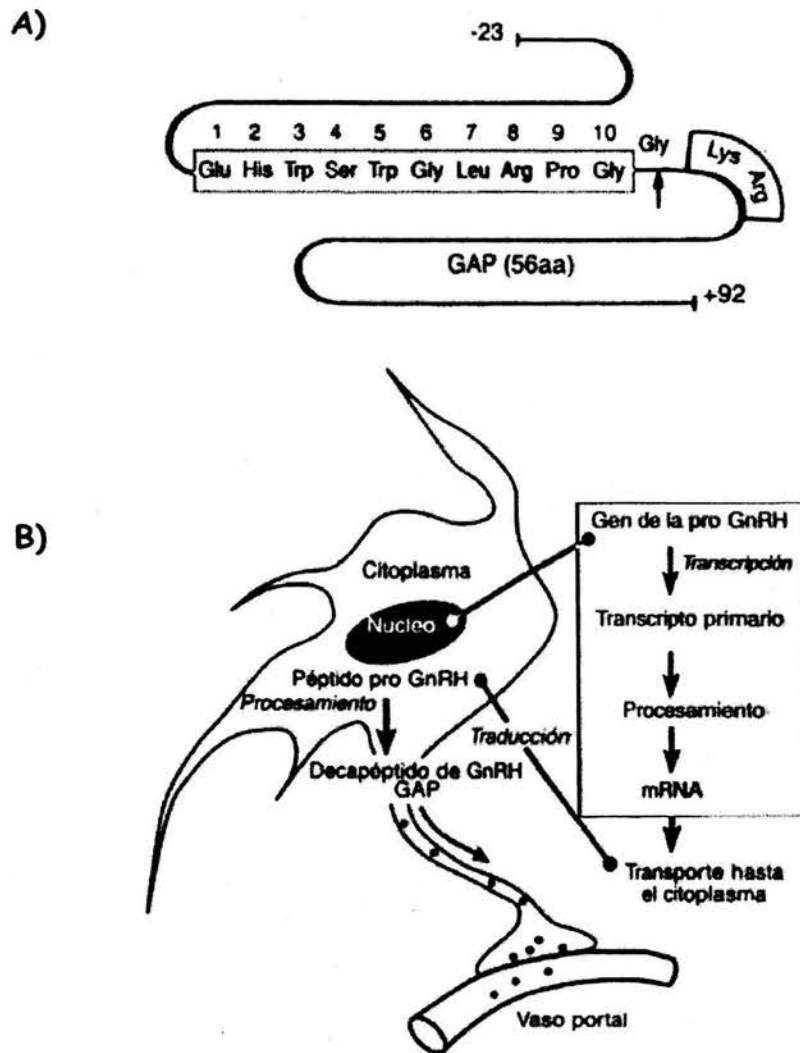


Figura 3. Gen de la GnRH y procesamiento de la molécula de pre-pro-GnRH. A) secuencia de 92 aminoácidos de pre-pro-GnRH. La fecha indica el sitio del procesamiento proteolítico y la amidación C-terminal de la molécula de GnRH. B) Proceso molecular de la GnRH. En el núcleo el gen de pro-GnRH es procesado a ácido ribonucleico mensajero (ARNm) después de la transcripción (Tomado de Yen, 2003).

Organización del sistema serotoninérgico

La mayor parte de las neuronas que sintetizan serotonina o 5-hidroxitriptamina (5-HT) se localizan en el cerebro medio (Frazer y Hensler, 1999). Dahlström y Fuxe (1964) describen nueve grupos de células que contienen 5-HT, que forman al núcleo del rafé y son designados de B1 hasta B9. Con base en la distribución de estas células, el núcleo del rafé se le divide en dorsal, medial y del puente. El núcleo del puente comprende B1 al B5, situado más caudalmente y es el núcleo que contiene menor número de células serotoninérgicas. El núcleo dorsal corresponde a los paquetes de somas de B6 y B7 y el núcleo medial, formado por el paquete B8 y parte del B9 (Figura 4) (Frazer y Hensler, 1999; Takeuchi, 1988).

Las fibras serotoninérgicas que inervan los diferentes estructuras del sistema nervioso central ascienden principalmente desde los núcleos dorsal y medial del rafé a la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, las áreas rostrales del sistema límbico, el hipotálamo y la eminencia media. En el hipotálamo, las fibras serotoninérgicas inervan los núcleos supraquiasmático, arcuato y dorsal medial, el cuerpo mamilar, las áreas periventricular preóptica y la eminencia media (Frazer y Hensler, 1999; Takeuchi, 1988).

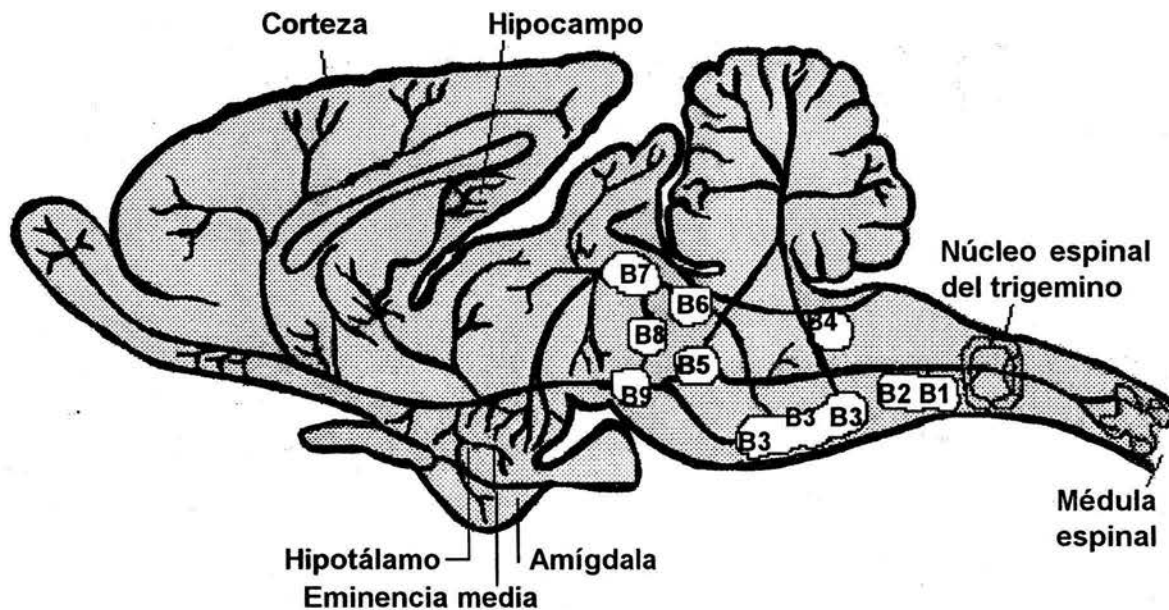


Figura 4. Esquema representativo de la localización de los cuerpos celulares serotoninérgicos y sus principales proyecciones en un corte sagital del cerebro de la rata (Frazer y Hensler, 1999).

En el cerebro de la rata, las neuronas serotoninérgicas están presente desde el día 12 de vida intra uterina. La proliferación de estas células finaliza en el día 18 de vida fetal y su arreglo final se lleva acabo dentro de los núcleos del rafé alrededor del día 21, donde se mantienen en la etapa adulta. El desarrollo axonal se inicia aproximadamente en el día 13, pero se completa en el día 19. Durante el desarrollo del animal, en el sistema nervioso central, el número de terminales serotoninérgicas cambia y disminuye el porcentaje de contactos sinápticos (Azmitia y Whitaker-Azmitia, 2000). En el día 17 de vida fetal, inmediatamente después de que la célula se ha diferenciado, las vías descendentes inician su desarrollo a las regiones más caudales del cerebro como la espina dorsal. Sin embargo, las fibras ascendentes completan su desarrollo en el día 21 postnatal y el patrón de

distribución es similar al observado en el animal adulto (Rajaofetra y col., 1989; Azmitia y Whitaker-Azmitia, 2000). Algunos autores sugieren que las neuronas serotoninérgicas inmaduras poseen actividad neurotrófica sobre el cerebro en desarrollo (Whitaker-Azmitia, 1991).

En el cerebro maduro se han identificado siete familias de receptores a serotonina que a su vez poseen subtipos, aunque su expresión y función no se han estudiado ampliamente (5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃, 5-HT₄, 5-HT₅, 5-HT₆ y 5-HT₇). En la rata, el receptor 5-HT_{1A} se expresa desde el día 12 de vida fetal, se incrementa y alcanza su máximo en el día 15 y poco tiempo después disminuye, pero nunca vuelve a expresarse en la misma intensidad. Algunos autores sugieren que el receptor 5-HT_{1A} es un factor autorregulador del desarrollo del sistema serotoninérgico (Azmitia y Whitaker-Azmitia, 2000).

Síntesis

No todas las células que contienen serotonina la sintetizan. Así, las plaquetas almacenan la amina que circula en el plasma por un mecanismo de transporte activo que se encuentra en sus membranas.

En el sistema nervioso central, el paso inicial en la síntesis de 5-HT es el transporte facilitado del aminoácido L-triptofano de la sangre hasta el cerebro a través de la barrera hematoencefálica. El triptofano es un aminoácido esencial, consumido en la dieta. Su entrada al sistema nervioso central depende de su concentración en sangre y de la concentración de otros aminoácidos neutros como la fenilalanina, la leucina y la metionina. La enzima L-triptofano-5-monooxigenasa, también llamada triptofano hidroxilasa, convierte al L-triptofano en 5-

hidroxitriptofano (5-HTP). La activación de dicha enzima requiere de oxígeno molecular y un cofactor tiropteridina (como la L-eritro-tetrahydro-biopterina (BH₄), donador de electrones). Posteriormente, el 5-HTP por acción de la enzima decarboxilasa de aminoácidos aromáticos se convierte en 5-HT. La primera únicamente se localiza en células que sintetizan 5-HT y la segunda enzima está presente no sólo en las neuronas serotoninérgicas sino también en las neuronas catecolaminérgicas, donde convierte 3,4-dihidroxifenilalanina a dopamina. La diferencia en la distribución de las enzimas triptofano hidroxilasa y decarboxilasa de aminoácidos aromáticos radica en las condiciones de pH y la concentración del sustrato o del cofactor requeridos para la activación óptima de cada una ellas (Frazer y Hensler, 1999).

La 5-HT es almacenada en vesículas de secreción que no poseen adenosin tripfosfato y tienen una proteína llamada proteína unidora de la serotonina que es liberada junto con la amina. La serotonina es liberada por las dendritas o por la terminal nerviosa de la neurona serotoninérgica por exocitosis, como respuesta a un cambio en el potencial de membrana al ingresar Ca²⁺ extracelular dependiente de voltaje (Frazer y Hensler, 1999).

Degradación

La enzima monoamina oxidasa (MAO) es la encargada de catabolizar a la serotonina a 5-hidroxi-indoleacetaldehído y este producto es oxidado por una aldehído deshidrogenasa dependiente de NAD⁺ para formar ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) (principal metabolito de la serotonina en el cerebro) (Figura 5). El acetaldehído puede ser reducido por la enzima aldehído reductasa dependiente de NADH y formar alcohol 5-hidroxitriptofol. Existen dos isoenzimas

MAO, denominadas tipo A y tipo B, que son flavoproteínas localizadas en la membrana mitocondrial externa en neuronas serotoninérgicas, glía y en otras células, y es la MAO tipo A la que preferentemente cataboliza a la 5-HT (Frazer y Hensler, 1999).

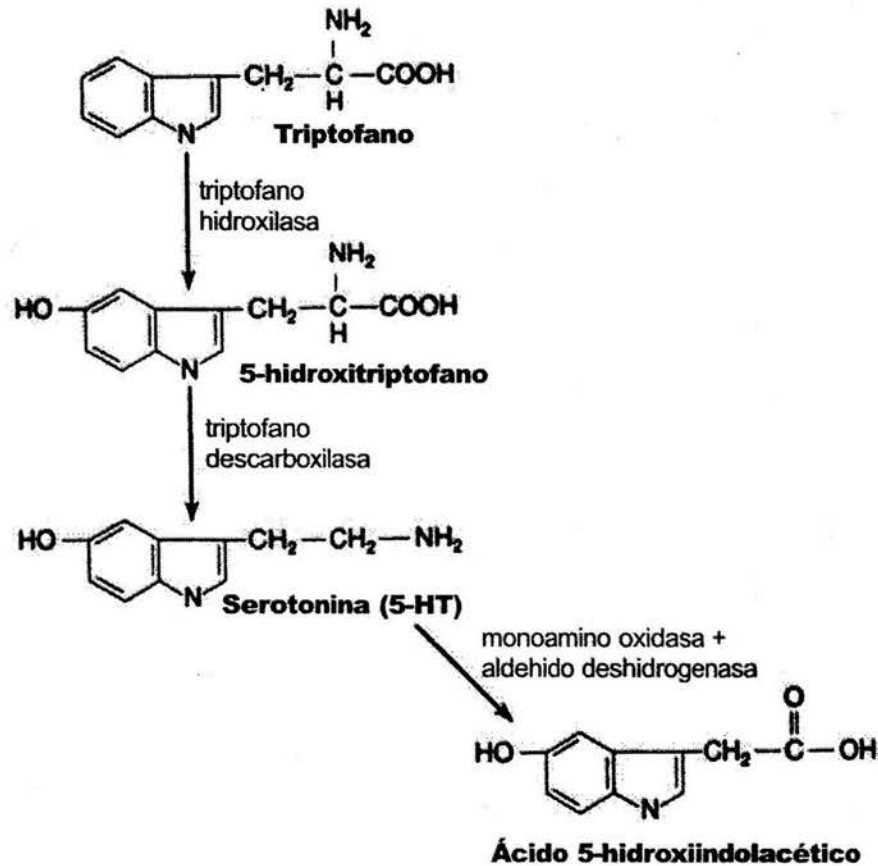


Figura 5. Biosíntesis y catabolismos de la serotonina (Frazer y Hensler 1999).

Núcleo dorsal del rafé

El núcleo dorsal del rafé (NDR) está localizado en la parte caudal de la sustancia gris periacueductal. Dicho núcleo posee entre 10,000 y 12,000 neuronas serotoninérgicas, que representan aproximadamente la tercera parte del total de las células contenidas en el núcleo (Jacobs y Azmitia, 1992). La población de neuronas serotoninérgicas en el NDR representa del 40-50% de todas las células que producen la 5-HT en el cerebro (Törk, 1985).

Las neuronas serotoninérgicas localizadas en el NDR poseen un retículo endoplásmico y vesículas de diferentes tamaños, algunas de las cuales se localizan desde el aparato de Golgi, pero no se han localizado cerca de la periferia del citoplasma. Además, las vesículas que almacenan la 5-HT son transportadas a lo largo del axoplasma dichas vesículas son las que se han identificado en la terminal nerviosa (Descarries y col., 1982). En la mayoría de las neuronas serotoninérgicas, el aparato del Golgi rodea al núcleo y llega hasta dentro de las dendritas, pero está ausente en los axones (Adell y col., 2002).

Las dendritas de las neuronas serotoninérgicas tienen espinas, pero son pobres en ramificaciones. En las dendritas se localiza la enzima triptofano hidroxilasa que indica que la serotonina puede ser sintetizada en esta región (Pickel y col., 1976). Chazal y Ralston (1987) reportan que en el NDR del gato existe dos tipos de dendritas: las que poseen vesículas sinápticas y las que no.

Los axones serotoninérgicos provenientes del núcleo dorsal del rafé (tipo D) son de calibre pequeño, no mielinizados y poseen pequeñas varicosidades pleomórficas (Baraban y Aghajanian, 1981; Beaudet y Descarries, 1981). Algunos

autores sugieren que estos axones son más vulnerables a la acción de los neurotóxicos derivados de las anfetaminas (Jacobs y Azmitia, 1992; Molliver, 1987).

En estudios experimentales empleando técnicas de inmunohistoquímica se ha mostrado que los núcleos del rafé contienen no sólo cuerpos celulares, dendritas y fibras de las neuronas serotoninérgicas (Halliday y col., 1995), si no que además se han identificado neuronas que expresan otros neurotransmisores como son dopamina, noradrenalina, glutamato, ácido γ -aminobutírico, encefalina, sustancia P, NPY, hormona liberadora de la tirotrópina, péptido intestinal vasoactivo, colecistoquinina, gastrina y neurotensina. En algunas fibras nerviosas se ha observado colocalización de 5-HT con GABA (Baumgarten y Grozdanovic, 2000; Törk, 1985). Descarries y col., (1982) reportan que la tercera parte de las neuronas contenidas en el NDR son serotoninérgicas.

Núcleo medial del rafé

El núcleo medial del rafé (NMR) se localiza en una porción central de la parte craneal de la médula, se extiende caudalmente desde la decusación del pedúnculo cerebelar superior hasta cerca del núcleo tegmental ventral. La extensión rostrocaudal del NMR es acompañado por el tracto tectoespinal con el que corre paralelamente. Los bordes laterales del NMR son definidos por los vasos sanguíneos de la línea media. Las neuronas que sintetizan 5-HT se localizan cerca de la línea media, muchas son pequeñas y de forma elipsoide y otras son fusiformes y tienen un tamaño medio (Törk, 1985). Este núcleo posee una proporción pequeña de neuronas serotoninérgicas (Moore, 1981; Wiklund y col., 1981).

Las neuronas serotoninérgicas en el NMR están organizadas en dos regiones continuas. Un grupo de neuronas serotoninérgicas están densamente empaquetadas en la región media, mientras que en la periferia del núcleo las neuronas se distribuyen más libremente (Halliday y col., 1995; Köhler y Steinbusch, 1982; Törk, 1990). Los axones que se originan de las neuronas serotoninérgicas del NMR se caracterizan por formar un par de pequeños haces de fibras que se localizan en ambos lados de la línea media (Törk, 1985; Zhou y col., 1998) Hasta el momento no se ha reportado que existan varicosidades en axones localizados en el NMR (Adell y col., 2002). Sin embargo, otros autores postulan que los axones serotoninérgicos que se originan en el núcleo medial (tipo M) son relativamente gruesos con grandes varicosidades esféricas (Frazer y Hensler, 1999). Los axones del núcleo medial son más resistentes al efecto de algunos neurotóxicos derivados de las anfetaminas (Jacobs y Azmitia, 1992; Molliver, 1987).

Las proyecciones ascendentes de los núcleos dorsal y medial conforman dos haces nerviosos que emergen del rafé hasta el cerebro anterior: el haz periventricular dorsal y las radiaciones ventrales tegmentales. Ambos convergen en el hipotálamo caudal donde se unen al haz medial del cerebro anterior. Los núcleos dorsal y medial del rafé dan salida a múltiples paquetes de axones que forman haces separados hacia las diferentes regiones del sistema nervioso central. En el cerebro las estructuras relacionadas funcionalmente son inervadas por el mismo grupo de neuronas serotoninérgicas. Por ejemplo, el hipocampo y el séptum (estructuras límbicas) parecen estar inervadas predominantemente por neuronas del NMR, mientras el estriado y la sustancia negra (sistema de los ganglios basales que median la actividad motora) son inervados por el NDR (Azmitia y Segal, 1978; Frazer y Hensler, 1999; Törk, 1985).

La fuente principal de serotonina del hipotálamo se origina en los núcleos dorsal y medial del rafé. Las fibras serotoninérgicas que provienen del núcleo dorsal inervan principalmente el hipotálamo anterolateral, el núcleo arcuato y la eminencia media (Peyron y col., 1998; Villar y col., 1984). El núcleo medial envía proyecciones nerviosas al área preóptica anterior y media, el área hipotalámica anterior y anterolateral y a el núcleo arcuato (Van de Kar y Lorens, 1979).

Participación de los núcleos dorsal y medial del rafé en la regulación de secreción de las gonadotropinas y la ovulación

Diversos estudios experimentales muestran que la inervación serotoninérgica que se origina en los núcleos dorsal y medial del rafé participa de manera diferente en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, tanto en el animal adulto como en el prepúber (Ayala y col., 1998; Morello y col., 1990; Morello y Teleisnik, 1985).

Algunos autores consideran que la señal serotoninérgica que se origina en el NDR estimula la secreción de las gonadotropinas (Meyer, 1978; Morello y Teleisnik, 1985; Vitale y col., 1987), en tanto otros sugieren que la inhibe (Arendash y Gallo, 1979). Una controversia similar ocurre con el núcleo medial. Meyer, (1978) propone que dicho núcleo participa en la regulación de manera estimulante, mientras que según otros autores este núcleo ejerce un efecto inhibitorio (Morello y col., 1989; 1990) o que no participa (Barofsky, 1975).

Estudios en el animal adulto

Cuando en la rata castrada adulta, con implante subcutáneo de estradiol, se seccionan las fibras serotoninérgicas que se originan en el NDR, la secreción de la LH disminuye (Héry, 1978). En la rata adulta en proestro, la lesión electrolítica del NDR resulta en la disminución de la concentración de la LH en plasma y el bloqueo de la ovulación, mientras que cuando se realiza la estimulación eléctrica no cambio dichos parámetros (Morello y Taleisnik, 1985). Estos resultados han sido utilizados como prueba de que la integridad del núcleo dorsal es esencial en la regulación en secreción de la LH y la ovulación, por lo que la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de la LH y la ovulación

Según Arendash y Gallo (1979) la estimulación eléctrica del NDR de ratas castradas resulta en disminución de la secreción de la LH, mientras dura la estimulación. Dichos resultados son interpretados como indicación de que la información serotoninérgica proveniente del NDR rafé inhibe la síntesis y liberación de la LH.

En la rata castrada tratada con estrógenos y progesterona, la lesión del NMR no modifica la liberación de LH. Dichos resultados han sido interpretados como prueba de que la inervación que proviene del núcleo medial no participa en los mecanismos que regulan la liberación de la LH (Barofsky, 1975). En cambio, en la rata adulta en proestro, la estimulación eléctrica del NMR bloquea la ovulación y disminuye la secreción de LH y no se observan modificaciones cuando se realiza la lesión del núcleo dorsal. Estos resultados llevan a los autores a sugerir que la

inervación serotoninérgica que se origina en el NMR ejerce un efecto inhibitorio en la secreción preovulatoria de la LH (Morello y Taleisnik, 1985).

Diversos estudios anatómicos empleando técnicas de inmunohistoquímica apoyan la idea de que el sistema serotoninérgico modula la secreción de las gonadotropinas por su interacción con las neuronas GnRHérgicas en el área hipotalámica anterior y la eminencia media (Jennes y col., 1982; 1983). También es posible que su acción sea de manera indirecta, al actuar sobre otro sistema de neurotransmisión como el noradrenérgico, GABAérgico y el dopaminérgico (Jennes y col., 1983; Morello y Taleisnik, 1988; Morello y col., 1989).

La administración sistémica de propranolol (bloqueador de los receptores β -adrenérgicos del tipo 2) o la inyección de serotonina en el *locus coeruleus*, a ratas adultas con lesión electrolítica del núcleo dorsal del rafé, resulta en la restauración de la ovulación y la secreción de la LH. Por otra parte, la microinyección de metilsergide (bloqueador de los receptores a serotonina del tipo 5-HT₁ y 5-HT₂) o la p-Clorofenilalanina (inhibidor de la triptofano hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de serotonina) en el núcleo del *locus coeruleus* resulta en el bloqueo de la liberación de la LH y la ovulación. Dichos resultados llevaron a los autores a proponer que el sistema serotoninérgico que se origina en el NDR estimula la secreción de LH y dicho efecto es por medio de las neuronas provenientes del *locus coeruleus* (Morello y Taleisnik, 1988).

Estudios en el animal prepúber

En la rata prepúber, la lesión del núcleo dorsal y medial del rafé, inducida por la inyección de 5,7-dihidroxitriptamina, bloquea la ovulación inducida por el

tratamiento con el suero de yegüa preñada y disminuye la recaptura de la serotonina en la eminencia media y el núcleo arcuato (Meyer, 1978). Diversas evidencias experimentales han mostrado que la 5,7-dihidroxitriptamina es neurotóxico de las neuronas serotoninérgicas, y también posee la capacidad de destruir a la neurona noradrenérgica (Da Prada y col., 1978). A partir de estos resultados los autores proponen que la serotonina secretada por el núcleo dorsal y medial ejerce un efecto estimulante sobre la secreción de las gonadotropinas (Meyer, 1978).

Estudios de nuestro laboratorio mostraron que la lesión térmica del NDR en la rata de 21 días de edad, resulta en el retraso de la edad de la apertura y del primer estro vaginal, pero la ovulación medida por el número de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados fue similar a los animales testigo. Los resultados son interpretados como que su ausencia es compensada por el núcleo remanente, lo que permite que se realice la regulación de los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la primera ovulación. Cuando la lesión del NDR se realizó a los 24 ó 27 días de edad, se observó un aumento significativo en el número de ovocitos liberados por animal ovulante, lo que indicaría que el NDR tiene un papel inhibitorio en la modulación de los mecanismos que regulan la primera ovulación. En cambio, cuando la lesión se realizó en ratas de 30 días de edad, ninguno de los animales tratados ovuló espontáneamente, por lo que su papel inhibitorio se transformaría en estimulante. En todos los grupos experimentales la concentración de serotonina en el hipotálamo disminuyó significativamente. Estos resultados han sido interpretados como un indicador de que el sistema serotoninérgico que se origina en el NDR, participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación, con variaciones que depende de la madurez del animal (Ayala col., 1998).

Como se expuso anteriormente el NDR no contiene exclusivamente somas serotoninérgicas (Strantford y Wirtshafter, 1990; Törk, 1985), por lo que es posible que las modificaciones de la ovulación, observadas en los animales con lesión térmica del NDR puedan ser el resultado de la eliminación de neuronas no serotoninérgica y de fibras nerviosas que pasan por el núcleo dorsal del rafé.

Recientemente hemos mostrado que en la rata hembra de 30 días de edad la lesión química del núcleo dorsal del rafé, inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) neurotóxico específico de la neurona serotoninérgica) resultó en el bloqueo de la ovulación e incrementa el índice de atresia en los ovarios. Además, la concentración de serotonina en estos animales disminuye en el hipotálamo anterior y medio, aunque dichos eventos no se acompañaron de modificaciones en la concentración de LH en plasma. Estos resultados nos llevan a pensar que en el animal prepúber, el sistema serotoninérgico que se origina en el NDR participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la primera ovulación (Monroy y col., 2000).

JUSTIFICACIÓN

La secreción de la GnRH, de las gonadotropinas, y el proceso de ovulación, están reguladas por diferentes sistemas de neurotransmisión entre los que se encuentra el serotoninérgico (Moguilevsky y Wuttke, 2001). La fuente principal de serotonina del hipotálamo se origina en los núcleos dorsal y medial del rafé (Takeuchi, 1988). Sin embargo los resultados obtenidos que apoyan la participación de estos núcleos en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, son contradictorios (Ayala y col., 1998; Barofsky, 1975; Morello y col., 1990).

Resultados recientes han mostrado que la lesión del núcleo dorsal del rafé en la rata de 30 días de edad bloquea la primera ovulación e incrementa el índice de atresia en los folículos preovulatorios, aunque estos eventos no se acompañan de modificaciones en la secreción de la LH (Monroy y col., 2000). Estos resultados permiten sugerir que la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR es esencial para que se lleve a cabo la ovulación. Sin embargo, se desconoce cuales son las causas por lo que la eliminación de la información serotoninérgica del núcleo dorsal del rafé bloquea la ovulación, donde las posibles explicaciones son:

- En los días previos al inicio de la pubertad, la información serotoninérgica originada en el NDR regule la secreción preovulatoria de la FSH y LH, y por lo tanto la ovulación.
- La falta de ovulación provocada por la lesión química del sistema serotoninérgico del núcleo dorsal del rafé se deba a que se afectó otro sistema extrahipotalámico de neurotransmisión.

- La falta de ovulación es el resultado del efecto inhibitorio que ejerce el núcleo medial, por la falta del núcleo dorsal, en los comandos de regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

Con el fin de estudiar la participación del sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo dorsal, sobre los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas, el inicio de la pubertad y la primera ovulación, en el presente proyecto se analizaron los efectos de la lesión química del núcleo dorsal del rafé, inducida por la microinyección de 5,6-DHT en el día 30 de edad, sobre las concentraciones en suero de las gonadotropinas, progesterona y estradiol así como las variaciones en el tamaño y distribución folicular del ovario en los días previos a la canalización vaginal.

También se estudió si el efecto estimulante que ejerce el NDR sobre la primera ovulación se establece vía el sistema noradrenérgico, por lo cual se analizaron los efectos del bloqueo o estimulación del sistema noradrenérgico, provocado por la administración sistémica de propranolol o isoproterenol en animales con lesión química del núcleo dorsal en el día 30 de edad, en las edades de la apertura y del primer estro vaginal y la primera ovulación.

Para analizar la participación en la regulación de la secreción de las gonadotropinas de la información serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del rafé, se estudiaron los efectos de la microinyección de 5-hidroxitriptofano en el núcleo medial sobre la secreción de las gonadotropinas y la concentración de serotonina en el hipotálamo.

HIPÓTESIS

Dado que en el animal prepúber, de 30 días de edad, la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé modula de manera estimulante los mecanismos neuroendocrinos que regulan la primera ovulación y si dicha participación es por medio del sistema noradrenérgico y dado que el núcleo medial no participa o ejerce un efecto inhibitorio en dichos mecanismos, las modificaciones en la información serotoninérgica del núcleo dorsal y medial inducirá alteraciones en la secreción de las gonadotropinas, lo que se traducirá en cambios en el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación del sistema serotoninérgico que se origina en los núcleos dorsal y medial del rafé en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y en la primera ovulación en la rata, así como correlacionar los resultados obtenidos para establecer la vinculación del sistema serotoninérgico con el sistema noradrenérgico.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Estudiar los efectos de la lesión química del núcleo dorsal del rafe, sobre la concentración de progesterona, 17β -estradiol, FSH y LH así como en el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico y la concentración de serotonina, noradrenalina, dopamina y sus metabolitos en el hipotálamo anterior, medio y posterior durante la etapa peripuberal de la rata.
2. Analizar los efectos de la administración de antagonistas o agonistas del sistema noradrenérgico en animales con lesión química del núcleo dorsal del rafe, sobre las edades de la apertura, primer estro vaginal y la primera ovulación, las concentraciones séricas de progesterona, 17β -estradiol y testosterona, así como las concentraciones de serotonina, noradrenalina, dopamina y sus metabolitos en el hipotálamo anterior, medio y posterior.
3. Estudiar los efectos de la estimulación química del sistema serotoninérgico del núcleo medial del rafe sobre las concentraciones en suero de las gonadotropinas, progesterona, y 17β -estradiol y las concentraciones de serotonina, noradrenalina, dopamina y sus metabolitos en el hipotálamo anterior, medio y posterior.

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV (bioterio FES-Zaragoza, México, DF.) de 30 días de edad mantenidas en condiciones controladas de iluminación: con 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días) y posteriormente al agua y al alimento hasta la autopsia.

Procedimiento de autopsia

Los animales fueron sacrificados por decapitación entre las 08:00 y 11:00. Se colectó la sangre del tronco, la que fue centrifugada durante 15 minutos a 3500 r.p.m., a 4°C. El suero se separó y almacenó a -20°C para la cuantificación de las hormonas esteroideas y gonadotropinas. A la autopsia se disecaron y pesaron en balanza de precisión los ovarios y el útero.

A grupos de animales con operación simulada o con lesión se les registró el día en que se presentó la canalización de la vaginal, momento en el cual se inició la toma de frotis vaginal diarios que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del primer estro vaginal. En los oviductos de los animales se contó el número de ovocitos liberados, cuando estuvieron presentes.

Procedimiento de lesión

Hembras de 30 días de edad fueron anestesiadas con pentobarbital sódico (anestésal, Smith Kline Norden de México, México) (40 mg/kg peso) inyectado por vía intraperitoneal seguido de anestesia complementaria con éter. Los animales

fueron montados en un aparato estereotáxico, se seccionó la piel, se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo una aguja de 29x13 mm conectada a una jeringa Hamilton, acoplada a una bomba de microdiálisis (MCA/100 Bionalytical Systems, USA). Las coordenadas para introducir la aguja de microinyección hasta el sitio de estudio, se calcularon tomando como referencia el atlas del cerebro del animal prepúber de Sherwood y Timiras (1970). Las coordenadas consideradas para el núcleo dorsal del rafé se tomaron con referencia a lambda y fueron: anteroposterior (AP) 0.7 mm, lateral (L) 3.3 mm con una inclinación de 30° perpendicular a la línea media y ventral (V) 6.4 mm. Para realizar la lesión del núcleo se inyectaron 10 μg de 5,6-DHT (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) en un volumen de 2.5 μl de solución de ácido ascórbico al 0.05 % (en solución salina al 0.9%) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) (pH 3.5). La velocidad de microinyección fue de 1 $\mu\text{l}/\text{min.}$, después de concluir la microinyección transcurrió un minuto antes de retirar la aguja del sitio de estudio.

Análisis del sitio de microinyección

Para la localización de la trayectoria de la aguja en los animales con operación simulada, lesión, solución salina o con 5-HTP, el tallo cerebral de los animales se fijó en formol al 10 % durante 24 h y se realizaron cortes corónales (de la región frontal a la caudal) a 120 μm en un criostato, los que se tiñeron con violeta de cresilo (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) (Lunas, 1975).

Análisis morfométrico

El análisis de la población folicular se realizó en los ovarios derecho e izquierdo de tres animales tomados al azar de cada grupo experimental. Los ovarios fueron fijados en solución de Bouin, deshidratados con alcohol e incluidos en

parafina. Se realizaron cortes seriados de 10 μm que se tiñeron con hematoxilina-eosina (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). Se revisaron todos los cortes y con la ayuda de un ocular micrométrico filar se midieron el diámetro mayor (D_1) y el perpendicular a éste (D_2) en los folículos que presentaron núcleo y nucleolo bien definido. Con el valor de los diámetros obtenidos de cada folículo se calculó el diámetro promedio.

El diámetro promedio se calculó con la siguiente relación:

Diámetro Promedio: (Diámetro mayor + Diámetro perpendicular) / 2

Los folículos se clasificaron por tamaño según los parámetros propuestos por Hirshfield (1978) en las siguientes categorías:

- Folículos pequeños: diámetro $<350 \mu\text{m}$.
- Folículos medianos: diámetro 351-499 μm .
- Folículos preovulatorios: diámetro $>500 \mu\text{m}$.

Además de considerar el tamaño de los folículos, también se consideró el estado de los mismos. Los folículos fueron considerados atrésicos cuando presentaron alguna 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 y alteración del ovocito (Greenwald y Roy, 1994).

Cuantificación de hormonas esteroideas y gonadotropinas

La cuantificación de progesterona, testosterona y 17β -estradiol se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, con un kit Coat-A-Count (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). La concentración de progesterona fue

expresada en nanogramos por mililitro (ng/ml) y la de 17 β -estradiol y testosterona en picogramos por mililitro (pg/ml). Los coeficientes de variación intra e intra ensayo fueron de 5.3 % y 9.87% para progesterona, 6.9 % y 10.8 % para 17 β -estradiol y para testosterona de 5.6 % y 8.7 %. El límite de detección para progesterona fue de 0.09, ng/ml, para 17 β -estradiol y testosterona fue de 0.004 y 5.0 pg/ml, respectivamente.

La cuantificación de FSH y LH se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo. La concentración de las gonadotropinas en suero se expresó en ng/ml, empleando anticuerpos para NIAMDD-RatA-LH-RP3 y NIAMDD-Rat-FSH-RP2 proporcionados por la National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fue de 7.91% y 5.74 % para LH, y 9.3 % y 6.82 % para FSH. El límite de detección de LH y FSH fue 0.05 y 0.01 ng/ml, respectivamente.

Cuantificación de neurotransmisores y sus metabolitos

A la autopsia de los animales de cada grupo experimental se extrajo el cerebro, el cual se colocó en solución fisiológica fría (0°C) y posteriormente se disecó el hipotálamo anterior, medio y posterior. En la disección del hipotálamo anterior se consideró como límite rostral el quiasma óptico y la comisura anterior, lateralmente por los surcos hipotalámicos laterales, y caudalmente por el área retroquiasmática y el tracto mamilotalámico. El hipotálamo medio se delimitó rostralmente por el tracto mamilotalámico y por el fornix, lateralmente por los surcos hipotalámicos y caudalmente por los cuerpos mamilares. En el hipotálamo posterior se consideró como límite rostral los cuerpos mamilares, lateralmente los

surcos hipotalámicos y caudalmente por la fosa interpeduncular y el área tegmental ventral. La profundidad del corte para la disección de cada una de las regiones del hipotálamo fue de 3 mm.

Las muestras se almacenaron a -70°C para su posterior procesamiento. La cuantificación de serotonina (5-HT), noradrenalina (NA) y dopamina (DA) y sus respectivos metabolitos el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), el ácido 4-hidroxi-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y el ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC), se realizó por la técnica de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Ayala y col., 1998).

La muestra de tejido de hipotálamo anterior, medio o posterior fue pesada individualmente en balanza de precisión y colocada en un tubo eppendorf de 1.5 ml y suspendido en 300 μl de ácido perclórico (HClO_4) 0.1N (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), posteriormente fue homogeneizado por sonicación en frío durante 5 segundos y centrifugado a 12,500 r.p.m. a -4°C por 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de celulosa de tamaño de poro de 0.45 μm (Millipore Bedford, MA, EUA) y 20 μl del extracto fueron inyectados en el sistema de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC).

El aparato HPLC consistió en una bomba de isocrática (Perkin-Elmer, Co., Norwalk, CT, EUA, modelo LC-250), detector amperométrico (Bionalytical Systems, Inc., EUA, modelo LC-4C) acoplado una celda de transductor LC-4A de carbón vidriado (Bionalytical Systems, Inc., EUA) de carbón vidriado al que se le aplicó un potencial de 0.850 V contra un electrodo de referencia de plata/cloruro de plata (Ag/AgCl), siendo la ganancia del detector de 5.0 nA., Columna fase reversa C-18

(4.6 mm d.i. x 25 cm) con partícula esférica de 10 μm de diámetro (Perky-Elmer, Co., Norwalk, CT, EUA). Las muestras procesadas de tejido se introdujeron en una válvula de inyección de seis puertos (Rheodyne, modelo 7125) con un loop de 20 μl .

La fase móvil consistió en buffer de citrato de sodio 0.1M (Merk-México) (pH 3.0), con 150 mg de ácido 1-octane-sulfonic (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), filtrada a vacío a través de una membrana de celulosa con tamaño de poro de 0.22 μm (Millipore Bedford, MA, EUA) y finalmente degaseada a vacío. Se adicionó 20 ml de acetonitrilo y 15 ml de tetrahidrofurano (OmniSolve, EM Science, Canadá). Un volumen total de 500 ml fue usado para el análisis de cromatografía. La fase fue bombeada a una velocidad de 1.2 ml/min.

Se emplearon soluciones estándar de NA, MHPG, DA, DOPAC, 5-HT y 5-HIAA (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA), preparadas y diluida en HClO_4 0.1N y almacenadas a $-70\text{ }^\circ\text{C}$. Las soluciones estándar fueron diluidas, el día en que las muestras problema fueron procesadas. El sistema fue calibrado con el método de estándar externo empleando el área de los picos obtenidos en el cromatograma de tres concentraciones diferentes de estándares como puntos de calibración (0.1, 0.5 y 1 nanogramos) y ajustando una curva lineal que incluye el origen por el método de regresión de mínimos cuadrados. Los valores de correlación obtenidos para cada uno de los estándares fueron mayor o igual a 0.98 para cada uno de los compuestos. La sensibilidad del ensayo para todos los neurotransmisores y metabolitos estuvo por encima de 0.01 ng. Los neurotransmisores fueron identificados por los tiempos de retención relativos. Empleando el integrador (Perkin-Elmer Nelson Co., EUA, modelo 1020), la concentración se calculó al comparar el área bajo la curva de la muestra problema, con el área bajo la curva de la solución de referencia de cada uno de los

neurotransmisores y metabolitos. Las concentraciones se expresaron en nanogramos por miligramo de tejido (ng/mg de tejido).

La actividad de la neurona serotoninérgica se calculó con la relación propuesta por Kerdelhue y col., (1989) y Shannon y col., (1986).

$$\text{Actividad de la neurona: } \frac{\text{[5-HIAA]}}{\text{[5-HT]}}$$

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos sobre la edad de la apertura vaginal, la edad del primer estro y el número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn y el número de folículos fue analizados por la prueba "U" de Mann-Whitney. El peso corporal, de los ovarios y del útero, la concentración de progesterona, testosterona, 17β -estradiol, FSH, LH, 5-HT, NA, DA y sus metabolitos fueron analizados por la prueba de varianza múltiple seguida de la prueba de Tukey. La tasa de animales ovulantes y el porcentaje de folículos atrésicos fueron evaluados por la prueba de probabilidad de Chi-Cuadrada. En todos los casos se consideraron diferencias significativas en aquellas en las cuales la probabilidad fue igual o menor al 5%.

Experimento 1

Efectos de la lesión del núcleo dorsal del rafé, sobre la concentración secreción de las gonadotropinas, esteroides y en el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico durante la etapa peripuberal de la rata

La lesión del núcleo dorsal del rafé bloquea la primera ovulación, incrementa el índice de atresia y disminuye la concentración de la FSH, sin que se observe modificaciones en la concentración de la LH en el día del primer estro vaginal (Monroy y col., 2000). Con la finalidad de analizar si la falta de ovulación es el resultado de modificaciones en la secreción de gonadotropinas en los días previos al inicio de la pubertad, se evaluaron los efectos de la lesión del núcleo dorsal del rafé, sobre la secreción de la FSH y LH durante la etapa peripuberal.

Como grupo de comparación se utilizó animales con operación simulada. Como grupo testigo absoluto se utilizaron ratas prepúberes sin tratamiento. Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados a los dos, cuatro, seis, ocho, 10 y 12 días después de la manipulación quirúrgica (Figura 6).

Al identificar el sitio de lesión se observó que la lesión del NDR comprendió rostralmente desde el borde caudal del núcleo del nervio traccalis y parte caudal del de la sustancia gris periacueductal y caudalmente los límites de la sustancia gris periacuedutal, lateralmente sustancia gris y ventralmente con el borde dorsal del fascículo longitudinal medial, además la lesión abarcó en su totalidad al núcleo dorsal del rafé (Figura 7).

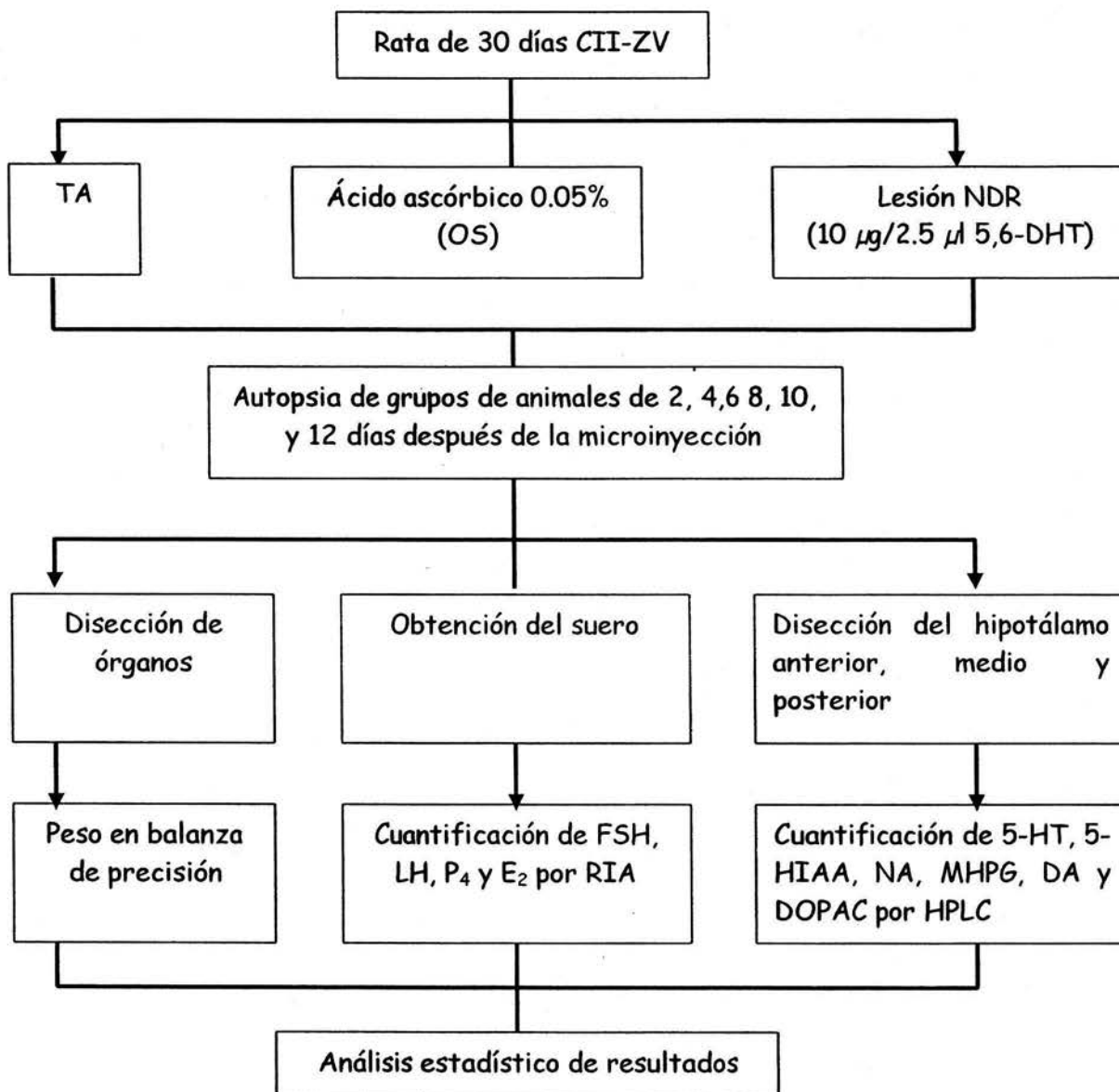
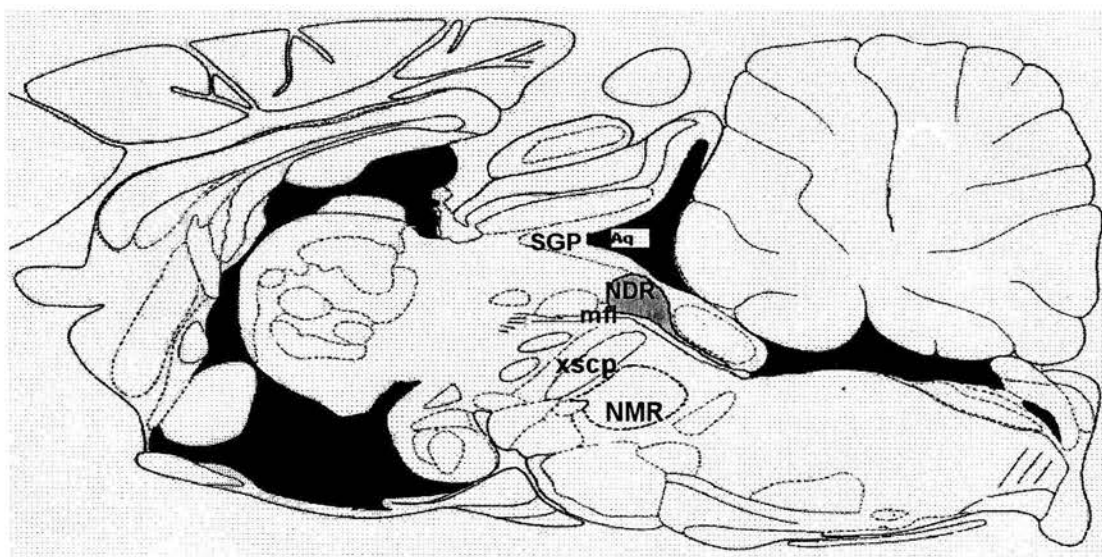


Figura 6. Esquema del método utilizado.

A)



B)

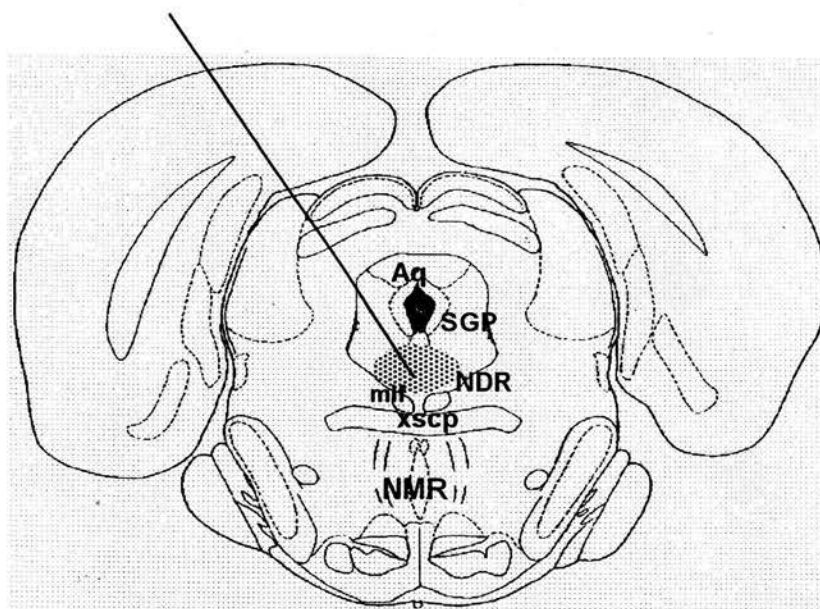


Figura 7. Esquema la extensión de la lesión del núcleo dorsal del raqué. La figura A corte sagital de cerebro de rata, representa la ubicación de la zona de estudio y la B corte coronal, la trayectoria de la aguja de inyección y el área sombreada representa la extensión de la lesión. Aq, acueducto; SGP, sustancia gris periaqueductal; mlf, fascículo longitudinal medial; NDR, núcleo dorsal del raqué, NDR, núcleo medial del raqué; xscp, decusación del pedúnculo cerebelar superior (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

RESULTADOS

a) Parámetros fisiológicos

En los animales con operación simulada el peso del útero fue significativamente mayor en los animales autopsiados seis días después de la operación simulada. El peso corporal y de los ovarios fueron similar a los del grupo testigo absoluto (Tabla 1).

En los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé producida por la inyección de la 5,6-DHT, sacrificados a los cuatro, seis y diez días de edad el peso corporal fue significativamente menor. En cambio, el peso absoluto de las gónadas fue similar al grupo con operación simulada durante los primeros ocho días y menor en los animales sacrificados en el día diez post-lesión. Así mismo, se observó la tendencia a un menor peso del útero, el cual únicamente llegó a ser estadísticamente significativo a los ocho días posteriores a la lesión (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. del peso corporal (PC) (g), de los ovarios (MO) y del útero (mg) de ratas de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la administración de 5,6-Dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y sacrificadas a diferentes tiempos después de realizar la lesión

Grupo	n	PC	MO	ÚTERO
2 Días				
TA	10	86.3 \pm 3.4	25.6 \pm 1.0	58.0 \pm 4.7
OS	10	83.6 \pm 2.7	23.6 \pm 1.6	45.6 \pm 8.5
Lesión	7	79.0 \pm 2.7	21.3 \pm 1.2	47.9 \pm 4.6
4 Días				
TA	10	87.4 \pm 2.4	27.5 \pm 1.4	60.8 \pm 3.7
OS	12	92.9 \pm 1.9	24.3 \pm 1.2	69.9 \pm 10.7
Lesión	7	85.7 \pm 2.8 ^b	27.0 \pm 4.8	57.3 \pm 9.5
6 Días				
TA	10	80.3 \pm 8.9	20.9 \pm 1.5	43.6 \pm 2.9
OS	11	96.9 \pm 2.8	23.9 \pm 1.0	61.3 \pm 3.0 ^a
Lesión	10	89.2 \pm 2.0 ^b	20.2 \pm 1.5	56.4 \pm 4.8
8 Días				
TA	10	100.8 \pm 4.3	22.5 \pm 1.8	64.3 \pm 8.2
OS	13	94.3 \pm 2.8	23.1 \pm 1.1	61.8 \pm 3.8
Lesión	6	91.2 \pm 4.3	22.9 \pm 1.5	47.8 \pm 3.9 ^b
10 Días				
TA	11	103.0 \pm 3.2	22.1 \pm 0.8	66.7 \pm 7.2
OS	7	106.3 \pm 2.0	23.2 \pm 1.2	77.2 \pm 11.3
Lesión	10	93.7 \pm 5.5 ^b	19.3 \pm 0.9 ^b	69.4 \pm 9.1
12 Días				
OS	7	111.7 \pm 3.0	22.1 \pm 1.8	76.8 \pm 13.3
Lesión	7	115.6 \pm 6.1	27.3 \pm 1.5	106.6 \pm 28.8

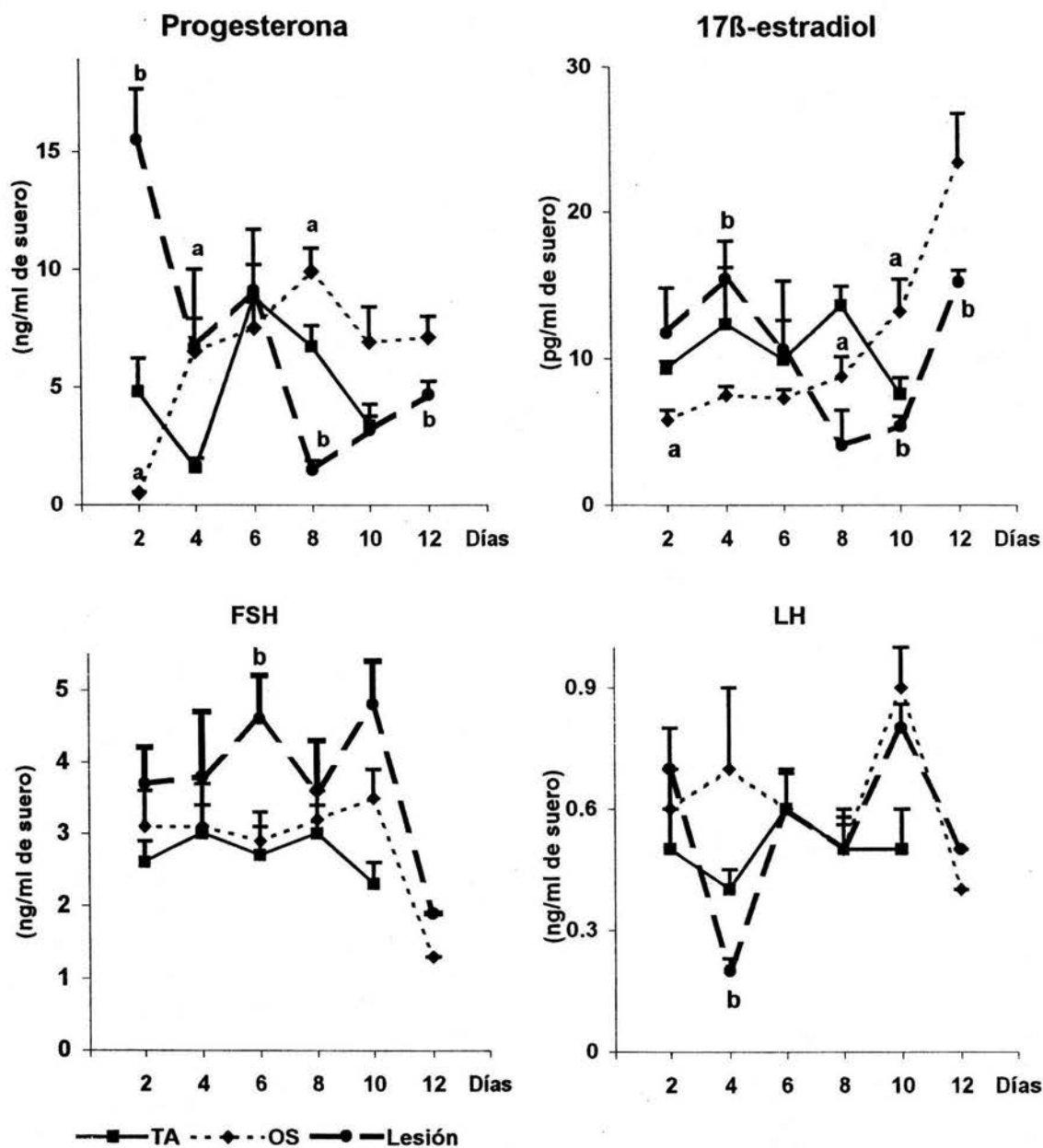
a, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo TA; b, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

b) Concentraciones en suero de hormonas

La concentración de progesterona fue significativamente menor 48 horas después de realizar la inyección de ácido ascórbico en el NDR. Esta tendencia se invirtió en los animales sacrificados cuatro u ocho días después de la intervención. La concentración sérica del 17β -estradiol presentó variaciones significativas en comparación con el grupo testigo absoluto, las que dependieron del momento del sacrificio de los animales y las concentraciones de FSH y LH no se modificaron (Figura 8).

En el suero de los animales con lesión completa del NDR producida por la microinyección de 5,6-DHT y sacrificados dos días después la concentración de progesterona fue mayor. Este comportamiento se revertió cuando los animales fueron sacrificados a los ocho o doce días post-lesión. La concentración sérica de estradiol también fue significativamente mayor al cuarto día postoperación y menor cuando los animales fueron sacrificados diez ó doce días después de la lesión (Figura 8).

La lesión del NDR no resultó en cambios significativos en la concentración sérica de FSH y LH, excepto en aquellos animales sacrificados en el día cuatro post-lesión, donde se observó una menor concentración de LH y en aquellos sacrificados en el día seis, en los que la concentración de FSH fue mayor que en el grupo con operación simulada (Figuran 8).



a, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo TA; b, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 8. Media \pm e.e.m. de la concentraciones de progesterona, 17β -estradiol, de la hormona foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), en el suero de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la administración de 5,6-Dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y sacrificadas a diferentes tiempos después de realizar la lesión.

c) Análisis morfométrico

En comparación al grupo de animales testigo absoluto, en los ovarios de los animales con operación simulada no se modificó el número de folículos medidos (Tabla 2).

En cambio, en los ovarios de los animales con lesión completa del núcleo dorsal del rafe sacrificados a los ocho y diez días, fue menor el número total de folículos presentes cuyo diámetro promedio fue entre 70 y 350 μm . En cambio, la tendencia se revertió en los animales sacrificados doce días posteriores a la lesión, en los que se observó un incremento significativo (Tabla 2).

Cuando se analiza la población folicular en función del diámetro y estado en los ovarios de los animales con inyección de 5,6-DHT sacrificados ocho y diez días, se observa un menor número de folículos sanos en el rango de pequeños y medianos. En cambio en el grupo de animales sacrificados a los doce días el número de este tipo de folículos incrementó significativamente.

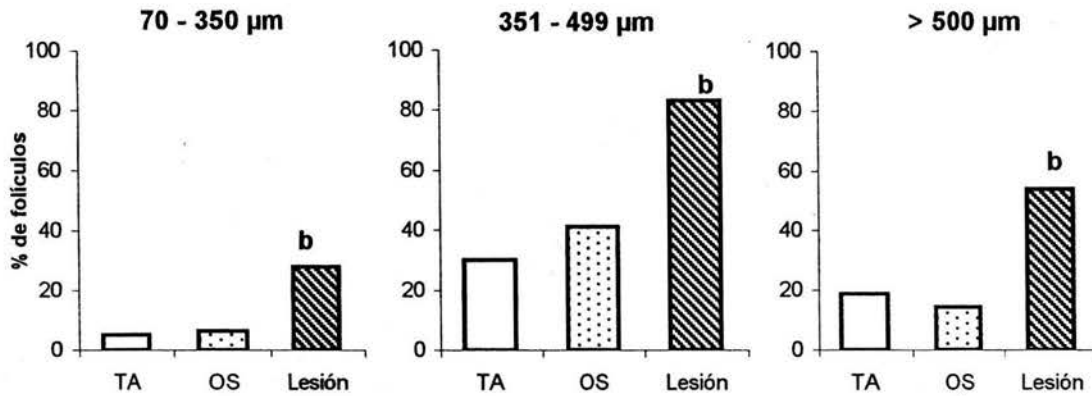
El número de folículos atrésicos pequeños (70 - 350 μm) y preovulatorios (> 500 μm) se incrementó en a los ocho días después de la lesión. Mientras que a los diez días únicamente se incrementó el número de folículos atrésicos medianos (351-499 μm) y a los 12 días se observó el aumento de la atresia en los tres rangos (Figura 9).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. del número de folículos totales y por rango presente en los ovarios de ratas testigo absolutas (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la administración de 5,6-Dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y sacrificadas a los ocho, diez y doce días después de realizar la lesión

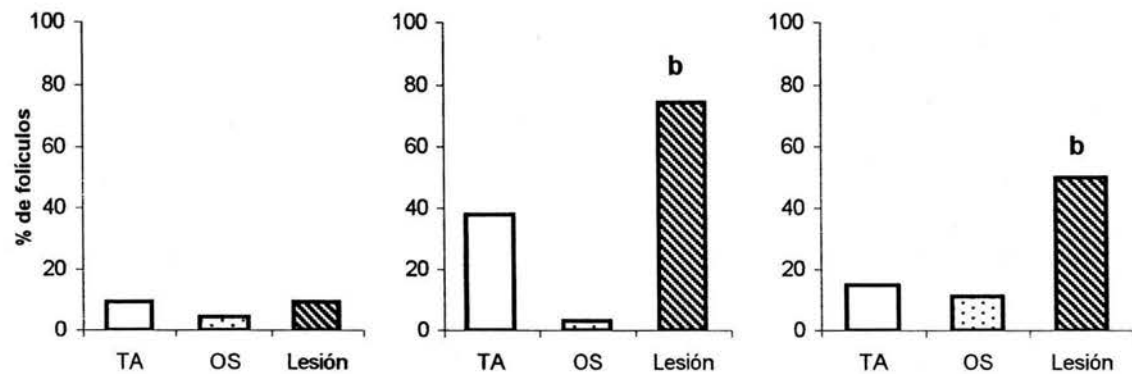
Grupo	Folículos Totales	Distribución por rango		
		< 350 μ m	350-499 μ m	> 500 μ m
8 Días				
TA	128.8 \pm 19.8	112.3 \pm 17.5	13.8 \pm 2.3	2.7 \pm 1.0
OS	139.8 \pm 8.0	123.5 \pm 5.4	14.2 \pm 1.2	1.2 \pm 0.5
Lesión	77.3 \pm 9.3 ^b	61.2 \pm 12.4 ^b	7.8 \pm 1.2	2.2 \pm 0.6
10 Días				
TA	95.0 \pm 7.4	84.7 \pm 6.6	7.5 \pm 2.1	2.3 \pm 1.2
OS	103.5 \pm 9.8	92.8 \pm 9.3	7.7 \pm 1.5	3.0 \pm 0.6
Lesión	72.5 \pm 7.0 ^b	63.0 \pm 6.3 ^b	7.2 \pm 1.3	2.3 \pm 0.8
12 Días				
OS	88.0 \pm 11.0	78.7 \pm 10.2	4.8 \pm 1.6	4.5 \pm 1.0
Lesión	143.8 \pm 10.5 ^b	132.7 \pm 9.4 ^b	12.2 \pm 1.5 ^b	4.0 \pm 1.1

^b, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo OS (Prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn).

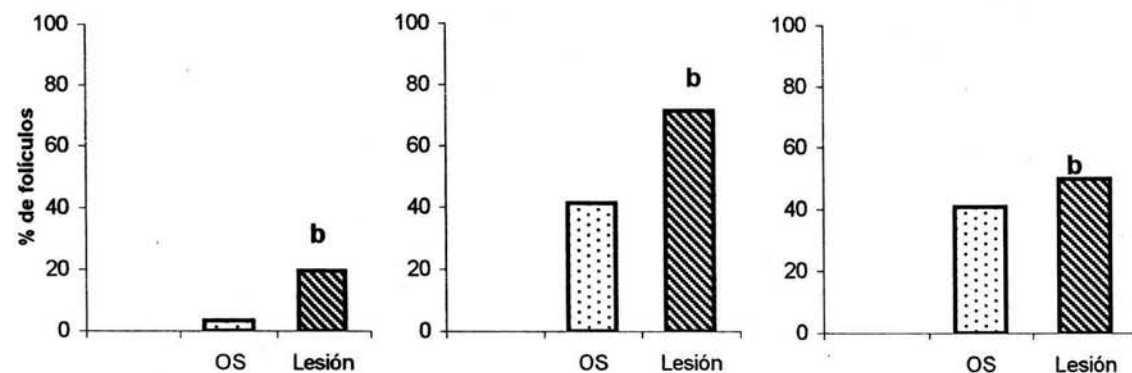
8 Días



10 Días



12 Días



b, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo OS (Prueba de Chi-Cuadrada).

Figura 9. Porcentaje de folículos atrésicos clasificados por rango presente en los ovarios de ratas, testigo absoluto (TA), o con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la administración de 5,6-Dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y sacrificadas a los 8, 10 y 12 días después de realizar la lesión.

d) Concentraciones en el hipotálamo de serotonina, noradrenalina y dopamina

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, la operación simulada no modificó la concentración de 5-HT y del 5-HIAA en las tres áreas hipotalámicas estudiadas (Figura 10).

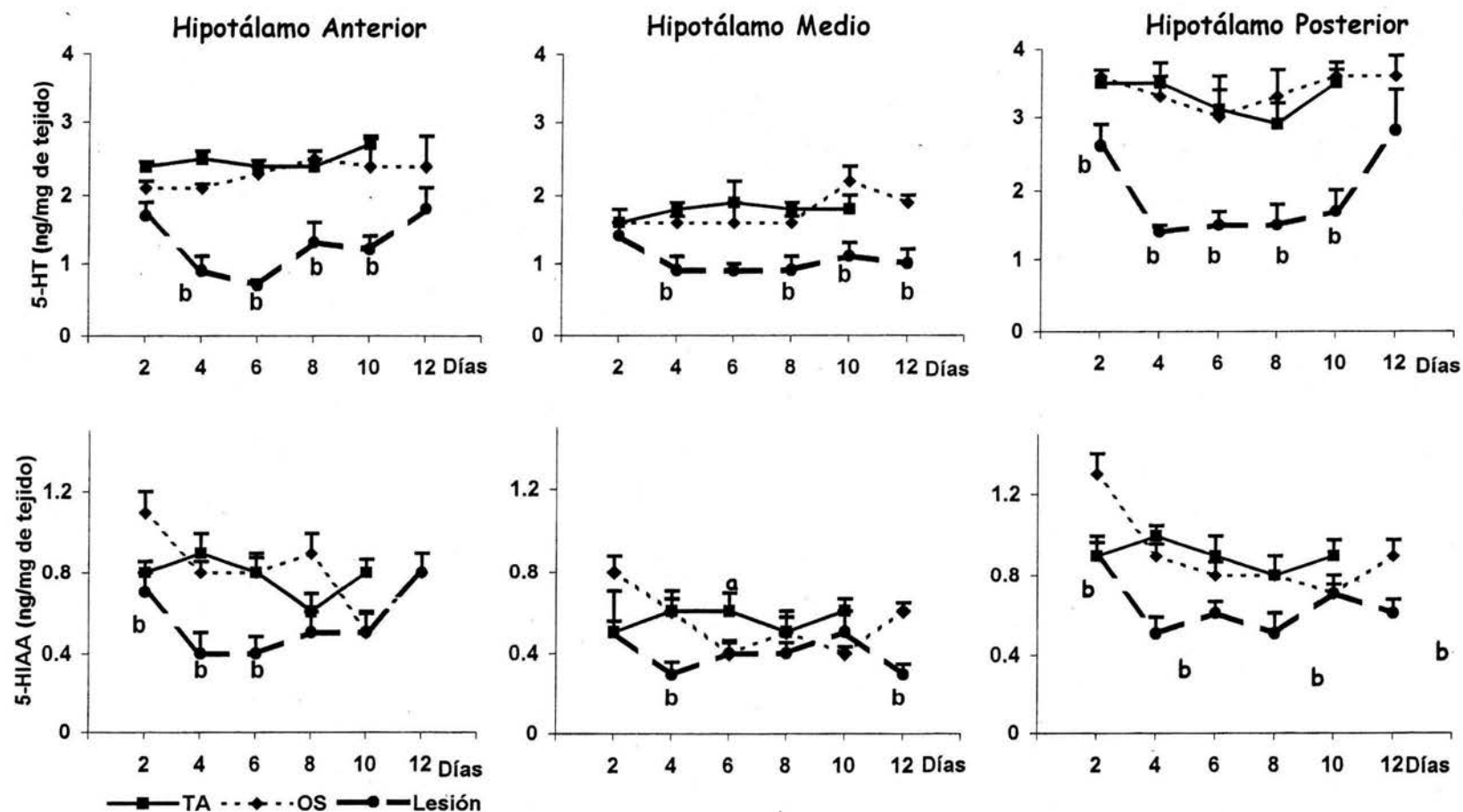
En el hipotálamo anterior y medio de los animales con operación simulada no se observaron cambios significativos en la concentración de NA y MHPG en comparación con los animales testigo absoluto. Sin embargo, en el hipotálamo posterior la concentración de NA fue mayor seis días después de la lesión (2.3 ± 0.3 vs. 1.4 ± 0.2 , $p < 0.05$) y la concentración de MHPG se comportó de manera inversa (0.5 ± 0.1 vs. 1.1 ± 0.1 , $p < 0.05$).

En el hipotálamo anterior de los animales sacrificados a los ocho y diez días después de la operación, se observó una mayor concentración de DA (Ocho: 0.3 ± 0.05 vs. 0.2 ± 0.01 , Diez: 0.3 ± 0.03 vs. 0.2 ± 0.01 , $p < 0.05$). La concentración de DOPAC fue mayor en el hipotálamo medio de los animales sacrificados a los dos o seis días después de realizar la microinyección (Dos: 0.2 ± 0.01 vs. 0.1 ± 0.02 ; Seis: 0.2 ± 0.02 vs. 0.1 ± 0.01 , $p < 0.05$). En el hipotálamo posterior no se observaron modificaciones en estos parámetros.

En comparación con el grupo con operación simulada, en los animales con lesión del NDR, la concentración de 5-HT fue significativamente menor en las tres áreas hipotalámicas estudiadas. En las áreas hipotalámicas anterior y posterior se observa una recuperación de este parámetro hacia el día 12 postoperatorio. Esta recuperación no se observó en el hipotálamo medio. La concentración de 5-HIAA

también disminuyó en los primeros días después de la lesión, con una recuperación en el hipotálamo anterior y variaciones en las regiones media y posterior del hipotálamo (Figura 10).

En el hipotálamo anterior y posterior de los animales con lesión del NDR no se observaron modificaciones en la concentración de NA, MHPG, DA y DOPAC. Sin embargo, en el hipotálamo medio de los animales sacrificados doce días después de la lesión, la concentración de NA fue menor (3.4 ± 0.4 vs. 6.9 ± 0.8 , $p < 0.05$). En el hipotálamo anterior de los animales sacrificados a los ocho días después de la lesión, se observó mayor concentración de DA (0.2 ± 0.03 vs. 0.3 ± 0.02 , $p < 0.05$).



a, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo TA; b, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo OS (ANDEVA seguida de la prueba Tukey).

Figura 10. Media \pm e.e.m. de la concentraciones (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) en el hipotálamo anterior, medio y posterior de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la administración de 5,6-Dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g}/2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y sacrificadas a diferentes tiempos después de realizar la lesión.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que en el animal prepúber la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR, modula de manera estimulante las funciones del ovario. El hecho de que no se presentaron modificaciones en la concentración de FSH y LH en los animales con lesión del núcleo dorsal sería un indicador de que el sistema serotoninérgico regula tales funciones por una vía neural entre el núcleo dorsal y los ovarios. Hasta el momento se ha descrito que existe comunicación directa entre el sistema nervioso central y la gónada (Gerendai y col., 2000), sin embargo, no se ha descrito que exista comunicación directa entre los núcleo del rafé y las gónadas. Por otra parte, no se descarta la idea que estos cambios estén vinculados a modificaciones en la secreción preovulatoria de la GnRH y por ello un menor número de folículo alcanzó el estado preovulatorio, se incrementó el índice de atresia y disminuyó la concentración de progesterona y estradiol por la disminución de serotonina en el hipotálamo.

Otra explicación a los cambios observados en las funciones de la gónada de los animales con lesión, se asocian a modificaciones en el sistema noradrenérgico debido al efecto que ejerce el NDR en dicho sistema, además se ha mostrado que el sistema noradrenérgico participa en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación (Kordon y col., 1994; Moguilevsky y Wuttke, 2001).

Experimento 2

Estudio de los efectos de la administración de antagonistas o agonistas del sistema noradrenérgico en animales con lesión del núcleo dorsal del rafé, sobre el inicio de la pubertad y la primera ovulación

Con la finalidad de analizar si el efecto estimulante que ejerce el núcleo dorsal del rafé en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la primera ovulación esté vinculado a modificaciones en el sistema noradrenérgico. También es posible que estos resultado sean la consecuencia del incremento en la actividad de sistema noradrenérgico por la falta de serotonina en el NDR. Para analizar esta posibilidad se evaluaron los efectos de la administración sistémica de propranolol (antagonista de los receptores β -adrenérgicos) o isoproterenol (agonista específico de los receptores β -adrenérgicos), sobre el inicio de la pubertad y la primera ovulación.

Grupos de hembras de 30 días de edad con lesión del núcleo dorsal del rafé, provocado por la inyección de 5,6-DHT, en el día 38 se les administró 6 mg/kg pc. de clorhidrato de D-L-propranolol (bloqueador de los receptores β -adrenérgicos) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) por vía i.p. A otro grupo de animales con lesión del NDR fueron tratados con 6 mg/kg de pc. de clorhidrato de isoproterenol (agonista de los receptores β -adrenérgicos) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA) con vía intra peritoneal en el día 38 de edad. Como grupo de comparación se utilizaron animales que recibieron 2.5 μ l de ácido ascórbico al 0.05% en el NDR (operación simulada) tratados con propranolol o isoproterenol. También se incluyeron animales con lesión o con operación simulada sin tratamiento de

propranolol o isoproterenol. Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados en el día del primer estro vaginal (Figura 11).

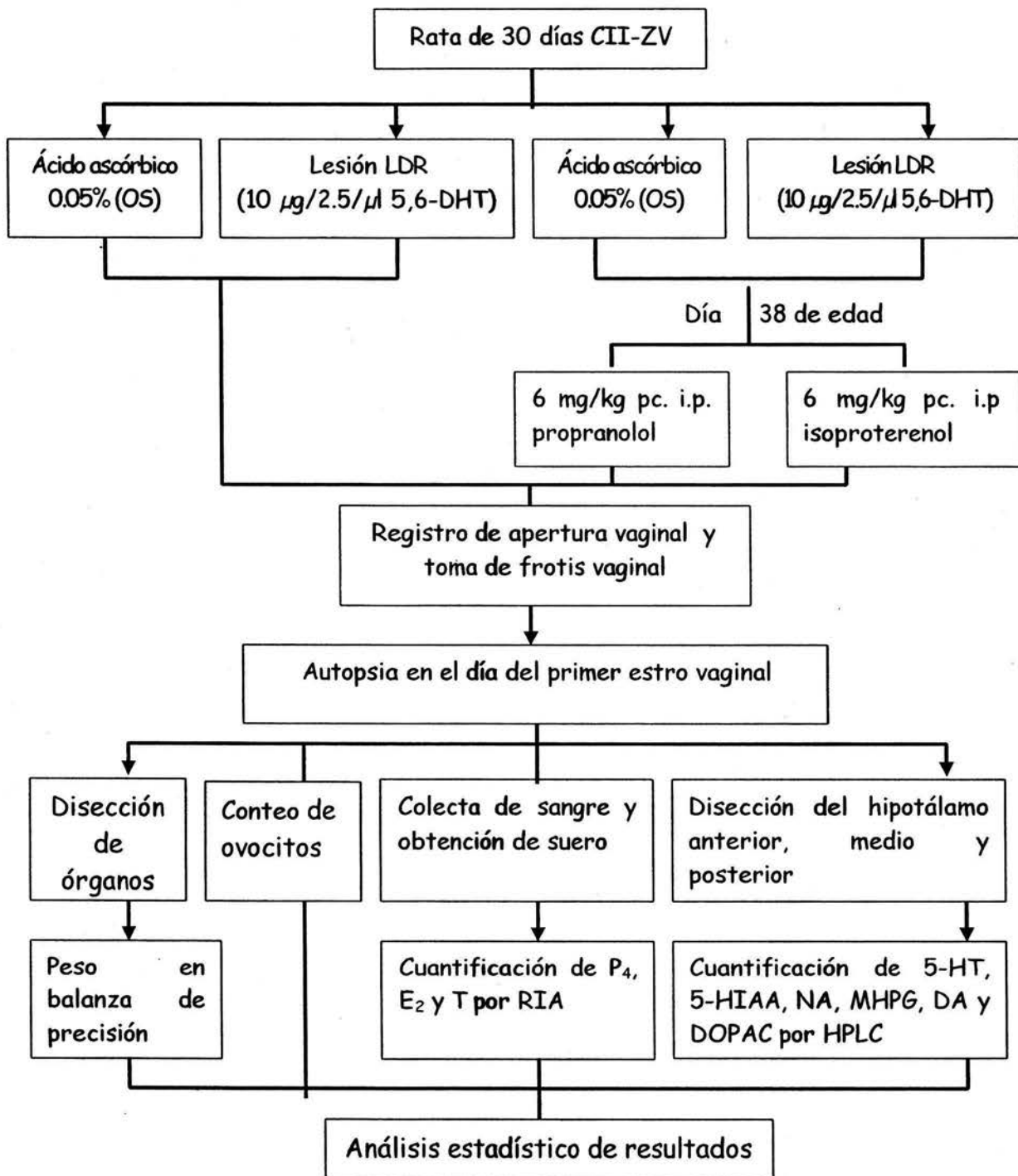


Figura 11. Esquema del método utilizado.

RESULTADOS

Efectos del bloqueo de los receptores β -adrenérgicos en animales con lesión del núcleo dorsal del rafe sobre el inicio de la pubertad y la primera ovulación

a) Parámetros fisiológicos

En comparación con los animales con operación simulada o con lesión del núcleo dorsal del rafe, en el grupo de animales tratados con propranolol, no se observó diferencias significativas en la edad de la apertura vaginal, del primer estro vaginal (Tabla 3) y en el peso corporal, de los ovarios y del útero (Tabla 4).

En el 73 % de los animales con lesión completa y tratados con propranolol, se presentó la ovulación en el día del primer estro vaginal (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. de la edad de apertura vaginal (EAV), primer estro vaginal (EPE) y el número de ovocitos liberados (OVO) por ratas con operación simulada (OS) con lesión del núcleo dorsal del rafe inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de propranolol en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	EAV	EPE	TAO	OVO
OS	43.4 \pm 0.8	44.3 \pm 0.7	16/18	8.9 \pm 0.6
OS + Propranolol	41.0 \pm 0.5	42.7 \pm 0.9	8/10	8.9 \pm 1.1
Lesión	44.1 \pm 1.1	46.0 \pm 1.5	0/11 ^{a,b}	0.0
Lesión + Propranolol	42.5 \pm 0.5	43.6 \pm 0.5	11/15 ^{a,c}	9.8 \pm 0.5

a, $p < 0.05$ vs. grupo OS; b, $p < 0.05$ vs. grupo OS+Propranolol; c, $p < 0.05$ vs. grupo Lesión (Prueba de Chi-Cuadrada).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. del peso corporal (PC) (g), de los ovarios (MO) y del útero (mg) de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de propranolol en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	n	PC	MO	ÚTERO
OS	18	126.0 \pm 1.5	36.9 \pm 1.5	186.2 \pm 6.4
OS + Propranolol	10	121.2 \pm 2.0	37.1 \pm 2.7	175.7 \pm 14.9
Lesión	11	127.5 \pm 5.4	32.8 \pm 2.8	206.3 \pm 11.6
Lesión + Propranolol	15	127.9 \pm 2.0	40.1 \pm 2.0	188.3 \pm 9.9

b) Concentraciones en suero de progesterona y 17 β -estradiol

En comparación con el grupo con lesión del NDR, la concentración de progesterona fue mayor en los animales tratados con propranolol después de la lesión y no se modificó la concentración 17 β -estradiol. La concentración de progesterona se incrementó en los animales con lesión previa al tratamiento con propranolol en relación con el grupo con operación (Tabla 4).

La concentración de testosterona fue mayor en los animales tratados con propranolol después de la operación simulada o de la lesión del NDR (Tabla 5).

Tabla 5. Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona, 17β -estradiol y testosterona en el suero de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafe inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de propranolol en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	Progesterona (ng/ml)	17β -estradiol (pg/ml)	Testosterona (pg/ml)
OS	7.1 ± 0.9	30.5 ± 5.0	nd
OS + Propranolol	8.3 ± 1.1	25.6 ± 7.6	40.0 ± 6.0
Lesión	2.1 ± 0.4^a	37.4 ± 4.3	nd
Lesión + Propranolol	7.8 ± 1.8^c	29.7 ± 7.4	180 ± 100

a, $p < 0.05$ vs. grupo S; c, $p < 0.05$ vs. grupo Lesión (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey). nd: no detectable.

c) Concentraciones en el hipotálamo de serotonina, noradrenalina y dopamina

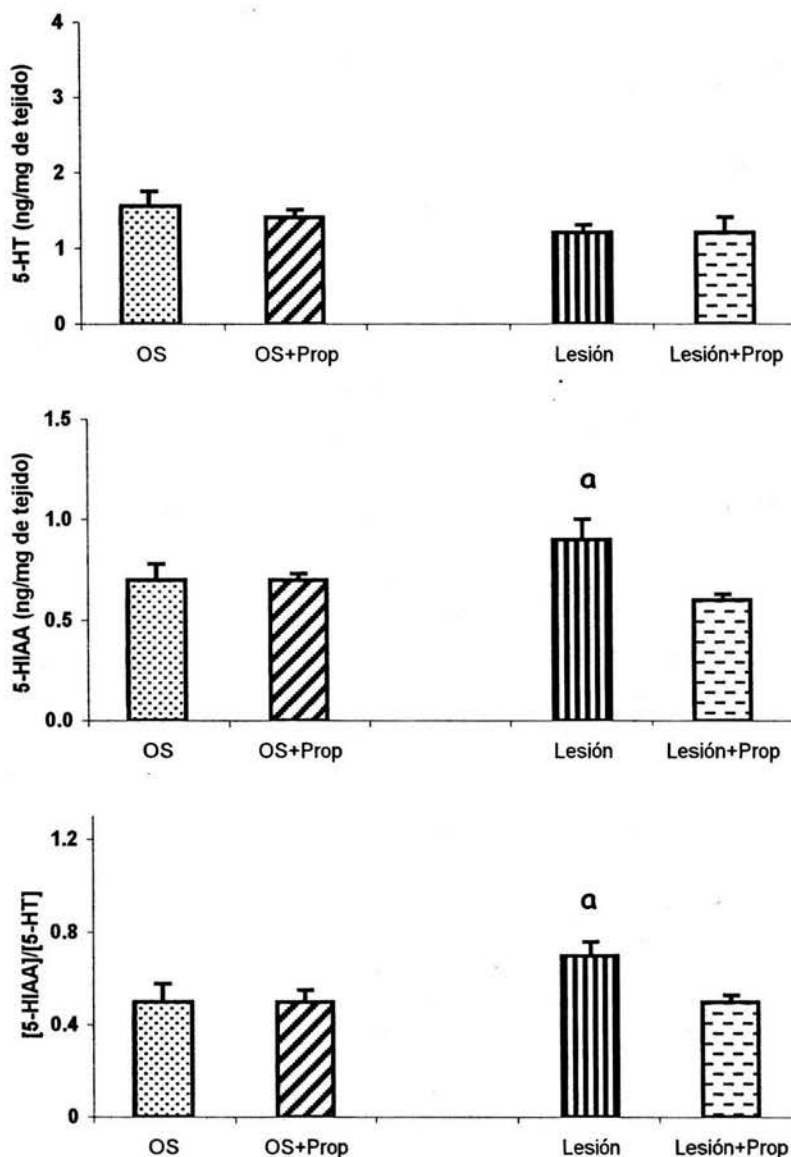
En comparación con el grupo de animales con lesión, la administración de propranolol no modificó la concentración de 5-HT en el hipotálamo anterior y medio. (Figuras 12 y 13). En cambio, en el hipotálamo posterior la concentración de 5-HT fue menor en los animales con lesión y tratados con propranolol sin llegar a ser estadísticamente significativa (Figura 14). La concentración del 5HIAA no se modificó de manera significativa en las tres regiones del hipotálamo de los animales que recibieron propranolol después de la lesión (Figuras 12, 13 y 14).

El incremento en la actividad de la neurona serotoninérgica observado en el hipotálamo anterior de los animales con lesión del NDR fue significativamente menor en los animales con lesión y tratados con propranolol. El bloqueo de los receptores β -adrenérgico no modificó la actividad de la neurona serotoninérgica en las tres

regiones del hipotálamo (Figuras 12, 13 y 14).

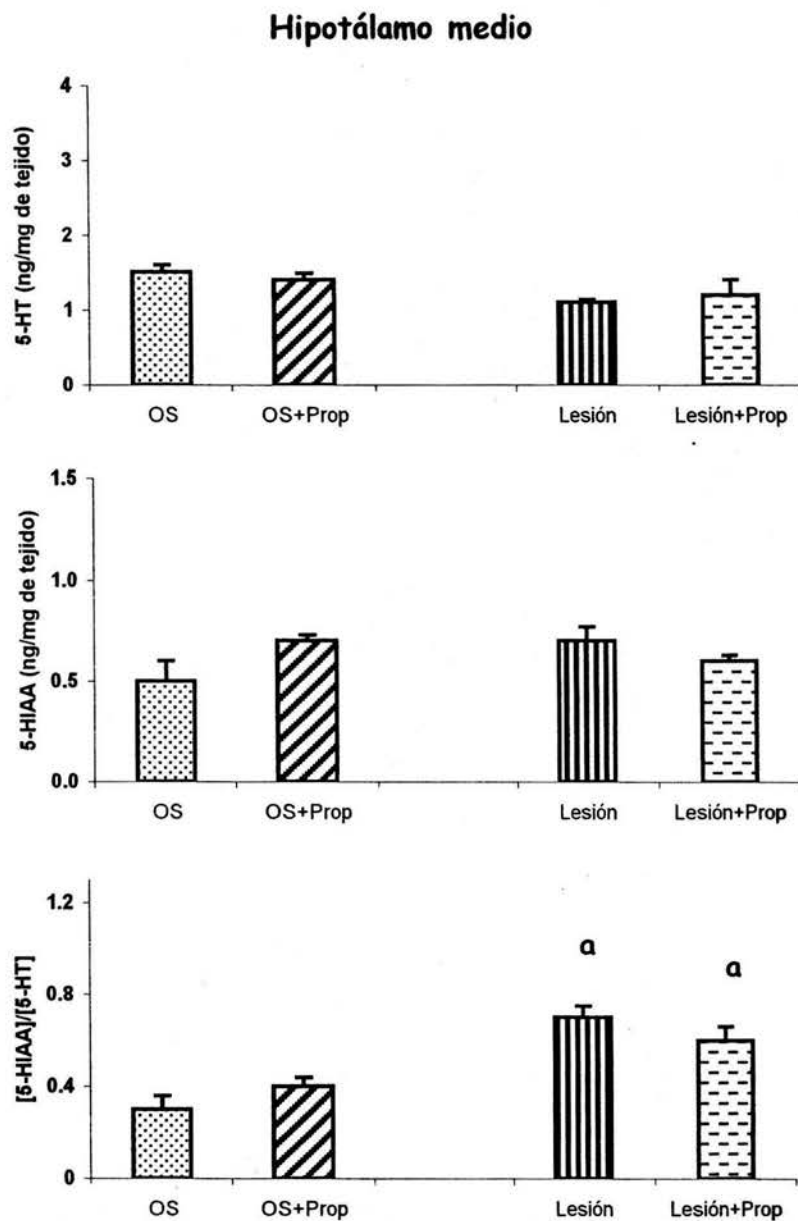
En comparación con el grupo de animales con lesión del NDR, el tratamiento con propranolol resultó en una menor concentración de NA en las tres regiones del hipotálamo. La concentración de DA no se modificó de manera significativa en las tres regiones del hipotálamo de los animales que recibieron propranolol después de la lesión (Tabla 6).

Hipotálamo anterior



a, $p < 0.05$ vs. grupo receptivo OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 12. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la administración de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g / 2.5 μ l) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de propranolol (Prop) en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



a, $p < 0.05$ vs. grupo OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 13. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo medio de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del raquí inducida por la administración de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de propranolol (Prop) en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

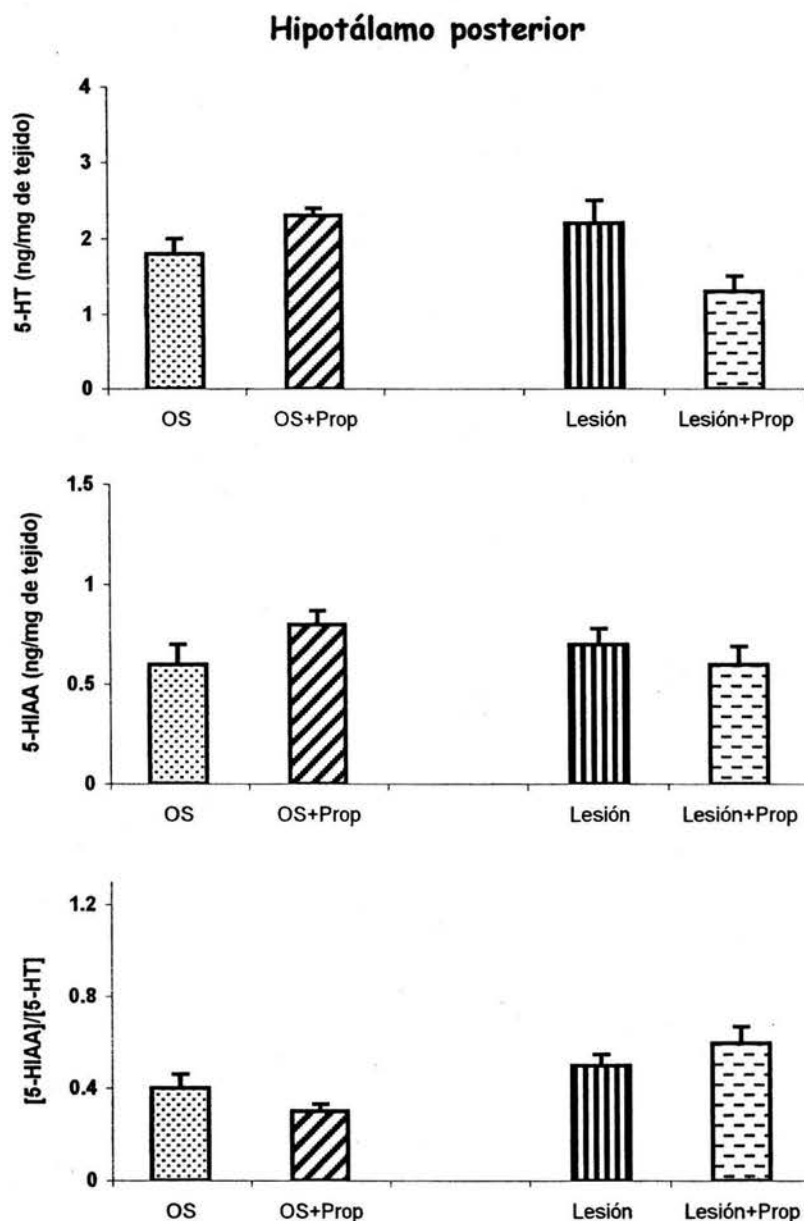


Figura 14. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo posterior de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. propranolol (Prop) en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Tabla 6. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3-4-dihidroxifenilacético (DOPAC) en el hipotálamo anterior, medio y posterior de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafe inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de propranolol en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	NA	MHPG	DA	DOPAC
Hipotálamo Anterior				
OS	3.1 \pm 0.3	nd	0.2 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01
OS + Propranolol	2.4 \pm 0.3	nd	0.2 \pm 0.03	nd
Lesión	3.0 \pm 0.3	nd	0.2 \pm 0.04	0.07 \pm 0.01
Lesión + Propranolol	2.0 \pm 0.2 ^{a,c}	nd	0.3 \pm 0.04	0.10 \pm 0.01
Hipotálamo Medio				
OS	3.9 \pm 0.3	nd	0.6 \pm 0.07	0.08 \pm 0.01
OS + Propranolol	2.9 \pm 0.4	0.4 \pm 0.08	0.4 \pm 0.03 ^a	nd
Lesión	3.9 \pm 0.4	nd	0.4 \pm 0.02 ^a	0.04 \pm 0.01
Lesión + Propranolol	2.3 \pm 0.1 ^{a,c}	0.3 \pm 0.03	0.5 \pm 0.04	nd
Hipotálamo Posterior				
OS	1.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.06	0.3 \pm 0.08	nd
OS + Propranolol	2.4 \pm 0.3 ^a	0.2 \pm 0.02 ^a	0.2 \pm 0.03	0.08 \pm 0.03
Lesión	1.2 \pm 0.1	nd	nd	nd
Lesión + Propranolol	0.7 \pm 0.1 ^{a,b,c}	0.5 \pm 0.04	nd	nd

a, p<0.05 vs. grupo, respectivo OS; b, p<0.05 vs. grupo, respectivo OS+Propranolol; c, p<0.05 vs. grupo, respectivo Lesión (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey) nd: no detectable.

Efectos de la estimulación de los receptores β -adrérgicos en animales con lesión del núcleo dorsal del rafé sobre el inicio de la pubertad y la primera ovulación

a) Parámetros fisiológicos

En comparación con los animales con operación simulada o con lesión del núcleo dorsal del rafé, en el grupo de animales tratados con isoproterenol, no se observó diferencias significativas en la edad de la apertura vaginal, del primer estro vaginal (Tabla 7) y en el peso corporal y de los ovarios. El peso del útero fue mayor en los animales con operación simulada y tratados con isoproterenol (Tabla 8).

En el 50 % de los animales con lesión del NDR y tratados con isoproterenol, se presentó la ovulación en el día del primer estro vaginal (Tabla 7).

Tabla 7. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. de la edad de apertura vaginal (EAV), primer estro vaginal (EPE) y el número de ovocitos liberados (OVO) por ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de isoproterenol en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	EAV	EPE	TAO	OVO
OS	43.4 \pm 0.8	44.3 \pm 0.7	16/18	8.9 \pm 0.6
OS + Isoproterenol	42.3 \pm 1.1	48.0 \pm 1.7	1/ 4 ^a	7.0
Lesión	44.1 \pm 1.1	46.0 \pm 1.5	0/11 ^a	0.0
Lesión + Isoproterenol	43.6 \pm 0.8	45.8 \pm 0.9	4/ 8 ^{b,d}	10.0 \pm 0.0

a, p <0.05 vs. grupo OS; b, p<0.05 vs. grupo OS+Isoproterenol; c, p<0.05 vs. grupo Lesión (Prueba de Chi-Cuadrada).

Tabla 8. Media \pm e.e.m. del peso corporal (PC) (g), de los ovarios (MO) y del útero (mg) de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafe inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de isoproterenol en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	n	PC	MO	ÚTERO
OS	18	126.0 \pm 1.5	36.9 \pm 1.5	186.2 \pm 6.4
OS + Isoproterenol	4	142.8 \pm 7.1	44.9 \pm 3.3	242.1 \pm 11.6 ^a
Lesión	11	127.5 \pm 5.4	32.8 \pm 2.8	206.3 \pm 11.6
Lesión + Isoproterenol	8	129.8 \pm 2.0	33.4 \pm 3.3	171.5 \pm 20.3

a, $p < 0.05$ vs. grupo OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

b) Concentraciones en suero de progesterona y 17 β -estradiol

En comparación con el grupo con lesión del NDR, la concentración del 17 β -estradiol fue mayor en los animales con lesión tratados con isoproterenol, mientras que la concentración de la progesterona fue ligeramente mayor sin llegar a ser estadísticamente significativa. La concentración de testosterona en todos los grupos estuvo por debajo de la sensibilidad del método utilizado (Tabla 9).

Tabla 9. Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona y 17β -estradiol en el suero de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafe inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de isoproterenol en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	Progesterona (ng/ml)	17β -estradiol (pg/ml)
OS	7.1 ± 0.9	30.5 ± 5.0
OS + Isoproterenol	10.3 ± 4.0	90.5 ± 3.5^a
Lesión	2.1 ± 0.4^a	37.4 ± 4.3
Lesión + Isoproterenol	3.5 ± 0.4^a	111.6 ± 10.3^c

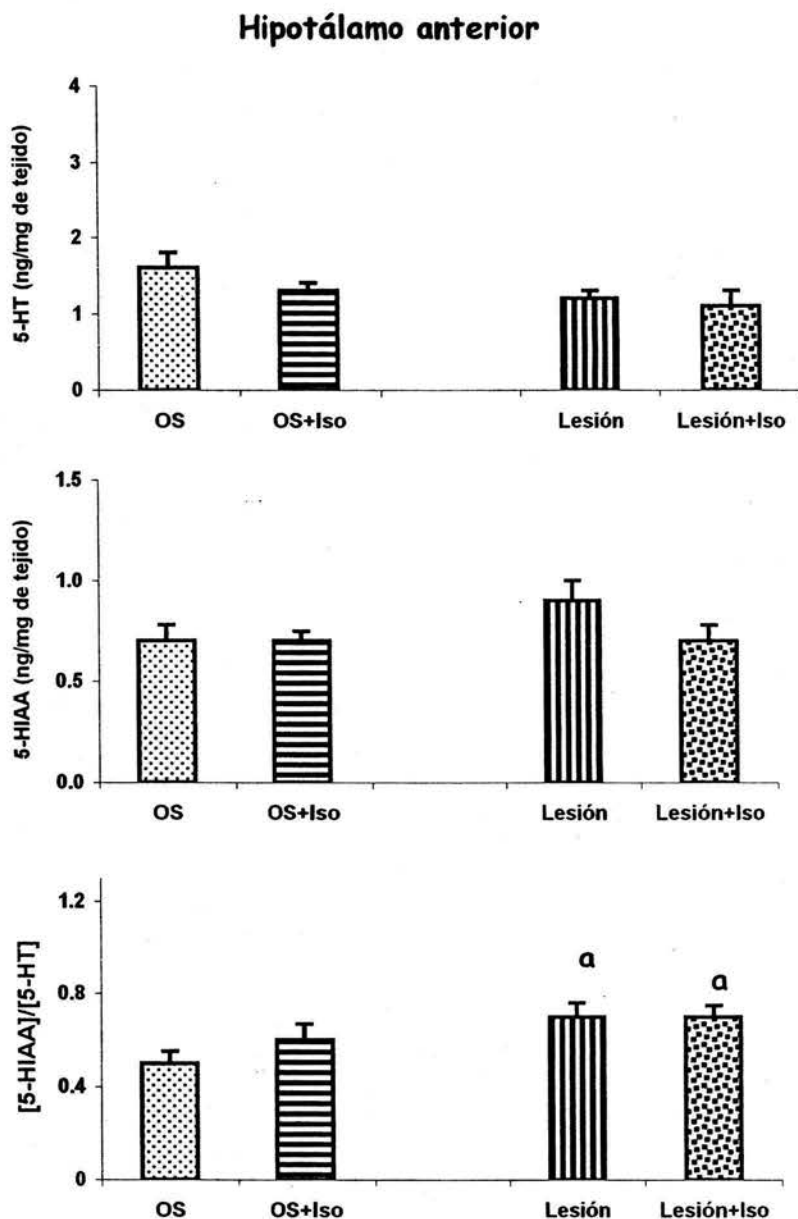
a, $p < 0.05$ vs. grupo OS; c, $p < 0.05$ vs. grupo Lesión (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

c) Concentraciones en el hipotálamo de serotonina, noradrenalina y dopamina

En comparación con el grupo de animales con lesión, el tratamiento con isoproterenol a los animales con lesión del NDR no modificó la concentración de 5-HT y del ácido 5-HIAA en el hipotálamo anterior y medio (Figuras 15 y 16). En cambio, en el hipotálamo posterior la concentración del 5-HIAA fue mayor en estos animales (Figura 17).

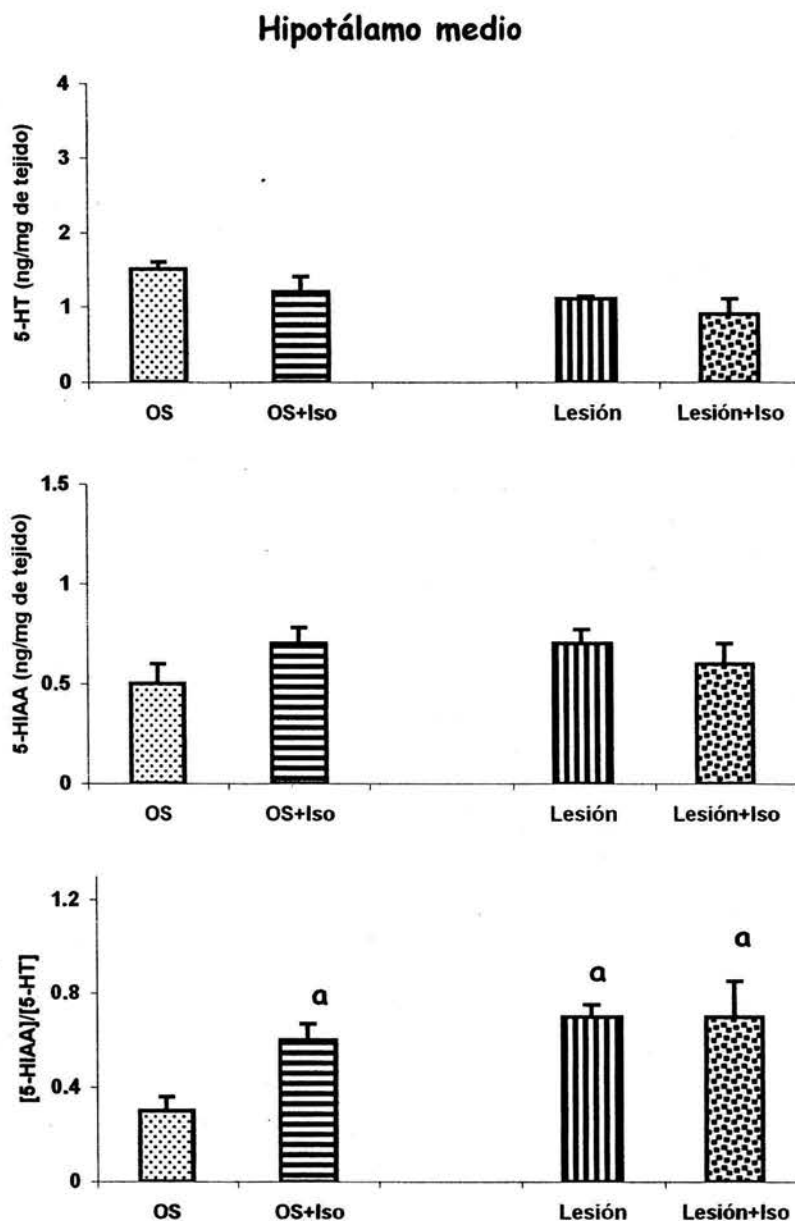
La actividad de la neurona serotoninérgica no se modificó en el hipotálamo anterior y medio de los animales tratados con isoproterenol con lesión previa (Figuras 15 y 16). En el hipotálamo posterior fue ligeramente mayor pero sin llegar a ser estadísticamente significativa (Figura 17).

En los animales con lesión del NDR y tratados con isoproterenol, la concentración de NA, MHPG y DOPAC fue similar al grupo lesión. En estos animales la concentración de DA fue mayor en el hipotálamo anterior y medio (Tabla 10).



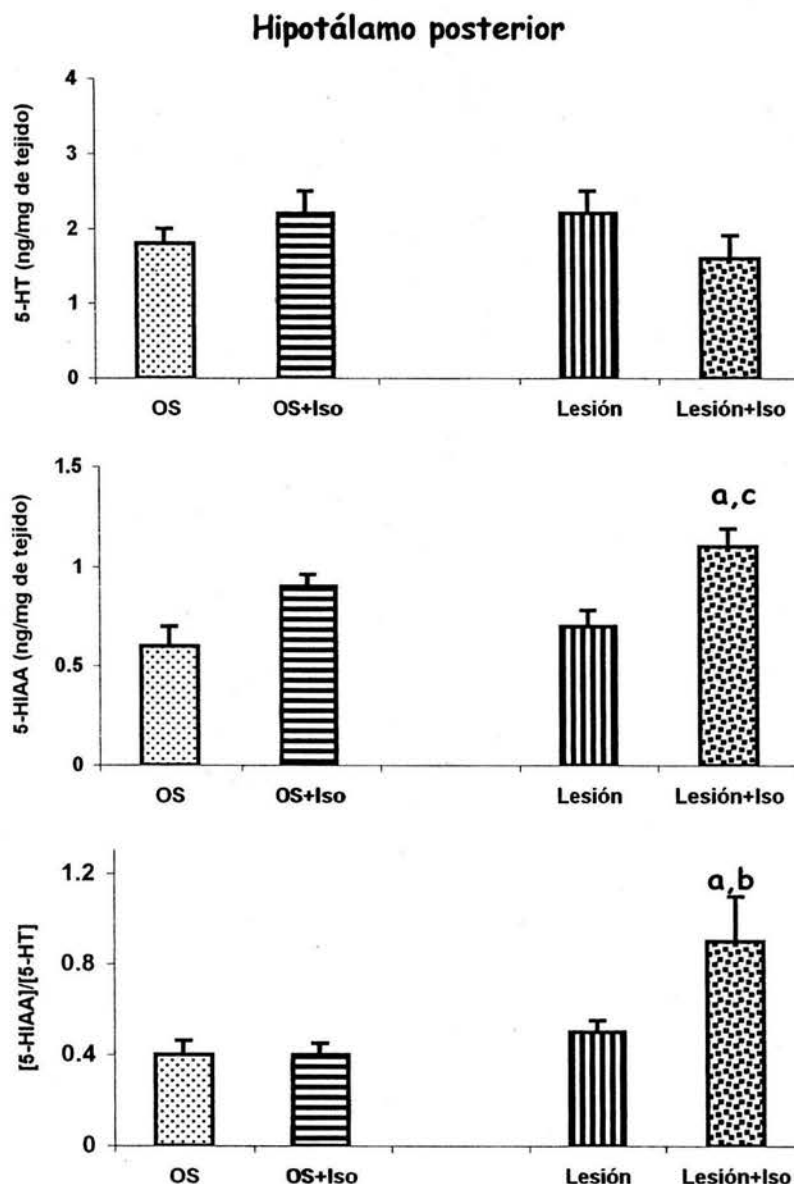
a, $p < 0.05$ vs. grupo OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 15. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de isoproterenol (Iso) en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



a, $p < 0.05$ vs. grupo OS (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 16. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo medio de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del raquí inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g} / 2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de isoproterenol (Iso) en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



a, $p < 0.05$ vs. grupo OS; b, $p < 0.05$ vs. grupo OS+Prop; c, $p < 0.05$ vs. grupo Lesión (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 17 Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo posterior de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafé inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de isoproterenol (Iso) en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Tabla 10. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol (MHPG), dopamina (DA) y del ácido 3-4-dihidroxi-fenilacético (DOPAC) en el hipotálamo anterior, medio y posterior de ratas con operación simulada (OS) o con lesión del núcleo dorsal del rafe inducida por la microinyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g /2.5 μ l) en el núcleo dorsal y tratadas con 6 mg/kg pc. de isoproterenol en el día 38 de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	NA	MHPG	DA	DOPAC
Hipotálamo Anterior				
OS	3.1 \pm 0.3	nd	0.2 \pm 0.02	0.06 \pm 0.01
OS + Isoproterenol	1.9 \pm 0.6	nd	0.5 \pm 0.09 ^a	nd
Lesión	3.0 \pm 0.3	nd	0.2 \pm 0.04	0.07 \pm 0.01
Lesión + Isoproterenol	2.3 \pm 0.2	nd	0.5 \pm 0.09 ^{ac}	nd
Hipotálamo Medio				
OS	3.9 \pm 0.3	nd	0.6 \pm 0.07	0.08 \pm 0.01
OS + Isoproterenol	2.5 \pm 0.1 ^a	nd	1.0 \pm 0.20	nd
Lesión	3.9 \pm 0.4	nd	0.4 \pm 0.02 ^a	0.04 \pm 0.01
Lesión + Isoproterenol	3.8 \pm 1.1	nd	1.3 \pm 0.30 ^c	nd
Hipotálamo Posterior				
OS	1.3 \pm 0.1	0.4 \pm 0.06	0.3 \pm 0.08	nd
OS + Isoproterenol	0.9 \pm 0.3	nd	nd	nd
Lesión	1.2 \pm 0.1	nd	nd	nd
Lesión + Isoproterenol	1.0 \pm 0.2	0.5 \pm 0.08	nd	nd

a, $p < 0.05$ vs. grupo OS; c, $p < 0.05$ vs. grupo Lesión (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey). nd: no detectable.

Los resultados obtenidos en este experimento nos inducen a pensar que la información serotoninérgica que proviene del NDR modula de manera estimulante los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas y la primera ovulación por sus efectos sobre el sistema noradrenérgico. La idea de la interrelación entre ambos sistemas se ha sugerido por las evidencias anatómicas que muestran que las

fibras serotoninérgicas que se originan en los núcleos del rafé inerva regiones del sistema nervioso central donde se localizan el grupo de neuronas noradrenérgicas como el *locus coeruleus* (McRae-Degueurce y col., 1981), la región ventrolateral del bulbo raquídeo (A1 y A3) (Takagi y col., 1981), la formación reticulada (A1/C1) y el complejo solitario (A2/C2) (Nicholas y Hancock, 1990; Törk, 1985) y a su vez envían fibras nerviosas al rafé (Barban y Aghajanian, 1981).

Es por lo anterior que nosotros pensamos que el hecho de que se restablezca la ovulación en los animales tratados con propranolol o isoproterenol con previa lesión del NDR depende del origen de la información noradrenérgica involucrada en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, pero que el efecto estimulante que ejerce la información serotoninérgica del NDR es por intermedio del sistema noradrenérgico.

Sin embargo, la falta de ovulación observado en los animales con lesión, posiblemente esté asociado al efecto inhibitorio que ejerce el NMR, por la falta del núcleo dorsal, en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

Experimento 3

Estudio de los efectos de la estimulación química del sistema serotoninérgico del núcleo medial del rafé sobre la secreción de las gonadotropinas

Se ha mostrado que la lesión química del núcleo medial del rafé no modifica la ovulación, lo que permite pensar que el núcleo medial no participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada en el animal prepúber o ejerce un efecto inhibitorio en dichos mecanismos. Para analizar si el sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo medial participa de manera inhibitoria en la regulación de la secreción de las gonadotropinas se evaluaron los efectos de la estimulación química del núcleo dorsal del rafé en la etapa prepuberal, sobre la secreción de FSH y LH así como en la concentración de serotonina en el hipotálamo.

Procedimiento de estimulación

A ratas hembras de 30 días de edad fueron montadas en el aparato estereotáxico de acuerdo al procedimiento descrito en la sección de materiales y método. Las coordenadas para la microinyección hasta el sitio de estudio, fueron calculadas tomando como referencia el atlas del cerebro del animal prepúber de Sherwood y Timiras (1970). Las coordenadas consideradas para el NMR son: AP 0.5 mm, L 4.9 mm con una inclinación de 35° perpendicular a la línea media y V 8.0 mm. Para la estimulación se realizó la inyección de 5-hidroxi-DL-triptofano (5-HTP) (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) a una dosis de 20 µg/2.5 µl. Como grupo de comparación se utilizaron animales de la misma edad a los que se les inyectó 2.5 µl de solución salina al 0.09%, a una velocidad de 1 µl/min. Los animales fueron sacrificados 60, 90 o 120 minutos después de la inyección (Figura 18).

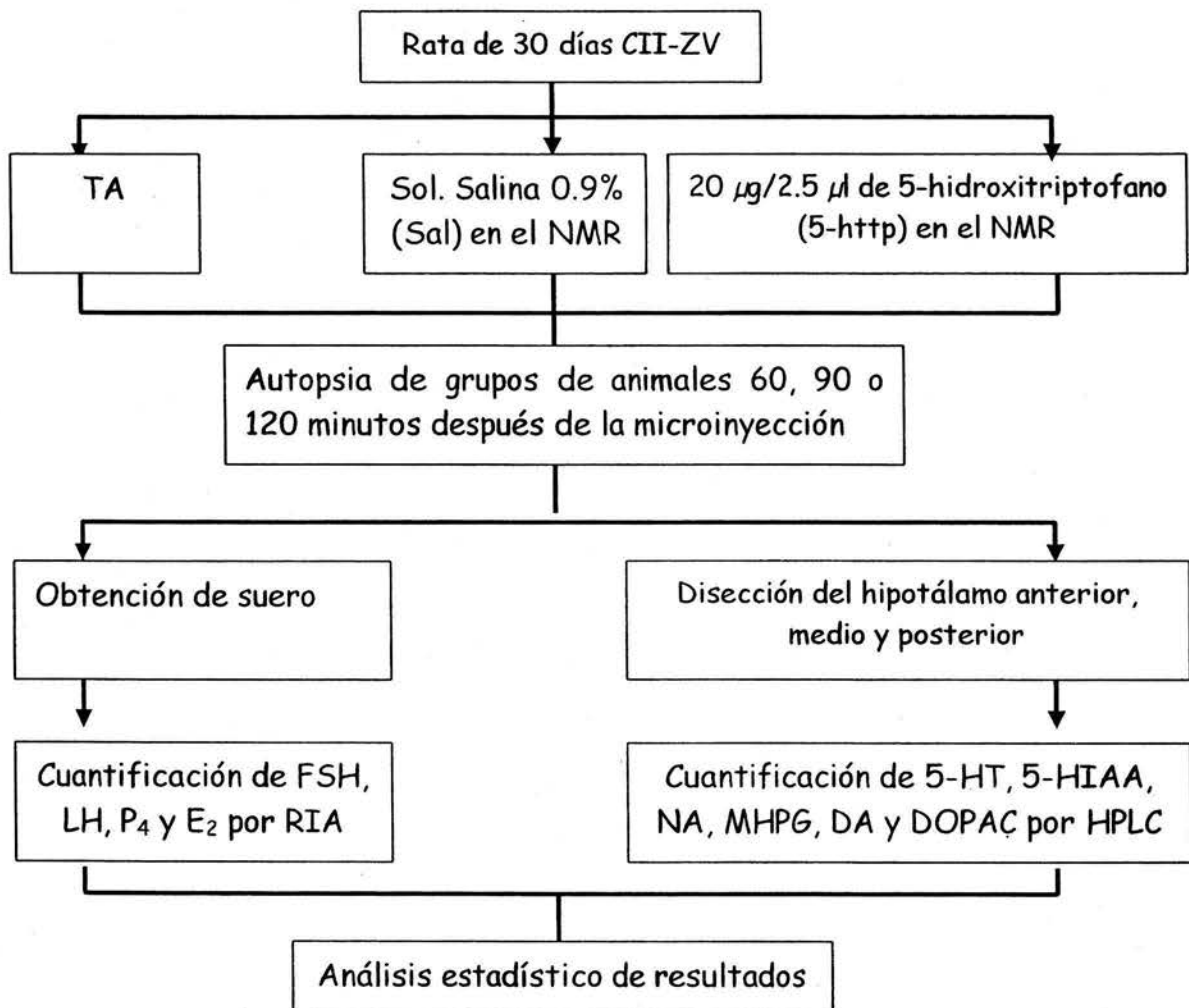
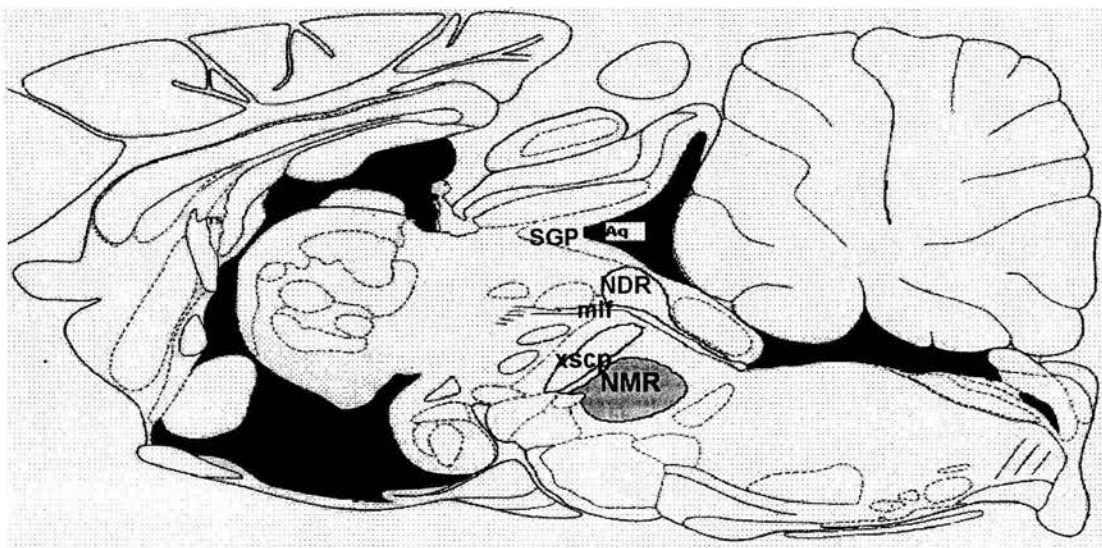


Figura 18. Esquema del método utilizado.

En la figura 19 se muestra la trayectoria de la aguja y la extensión de la microinyección. La estimulación del NMR se extendió rostralmente hasta los núcleos tegmental ventral; caudal, abarcó los límites del núcleo reticulotegmental; lateralmente, hasta los límites del tracto tectoespinal; y ventralmente, hasta los límites del área tectental ventral, la línea caudal del núcleo del rafé y del puente del rafé.

A



B

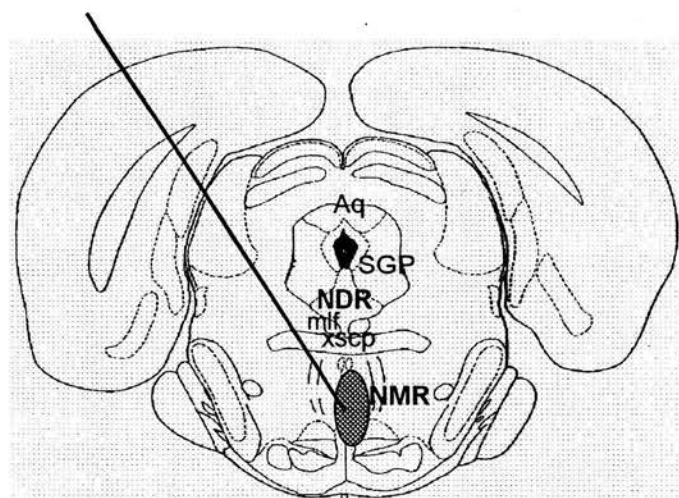


Figura 19. Esquema del sitio de inyección en el núcleo medial del raqué. La figura A corte sagital de cerebro de rata, representa la ubicación de la zona de estudio y la B corte coronal, la trayectoria de la aguja de inyección y el área sombreada representa la extensión de la lesión. Aq, acueducto; SGP, sustancia gris periacueductal; mlf, fascículo longitudinal medial; NDR, núcleo dorsal del raqué, NDR, núcleo medial del raqué; xscp, decusación del pedúnculo cerebelar superior (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

RESULTADOS

a) Concentraciones en suero de FSH y LH

En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales con operación simulada, la concentración de FSH aumentó significativamente 120 minutos después de la microinyección. La concentración sérica de LH también mostró un aumento significativo a los 60 minutos postoperatorios (Figura 20).

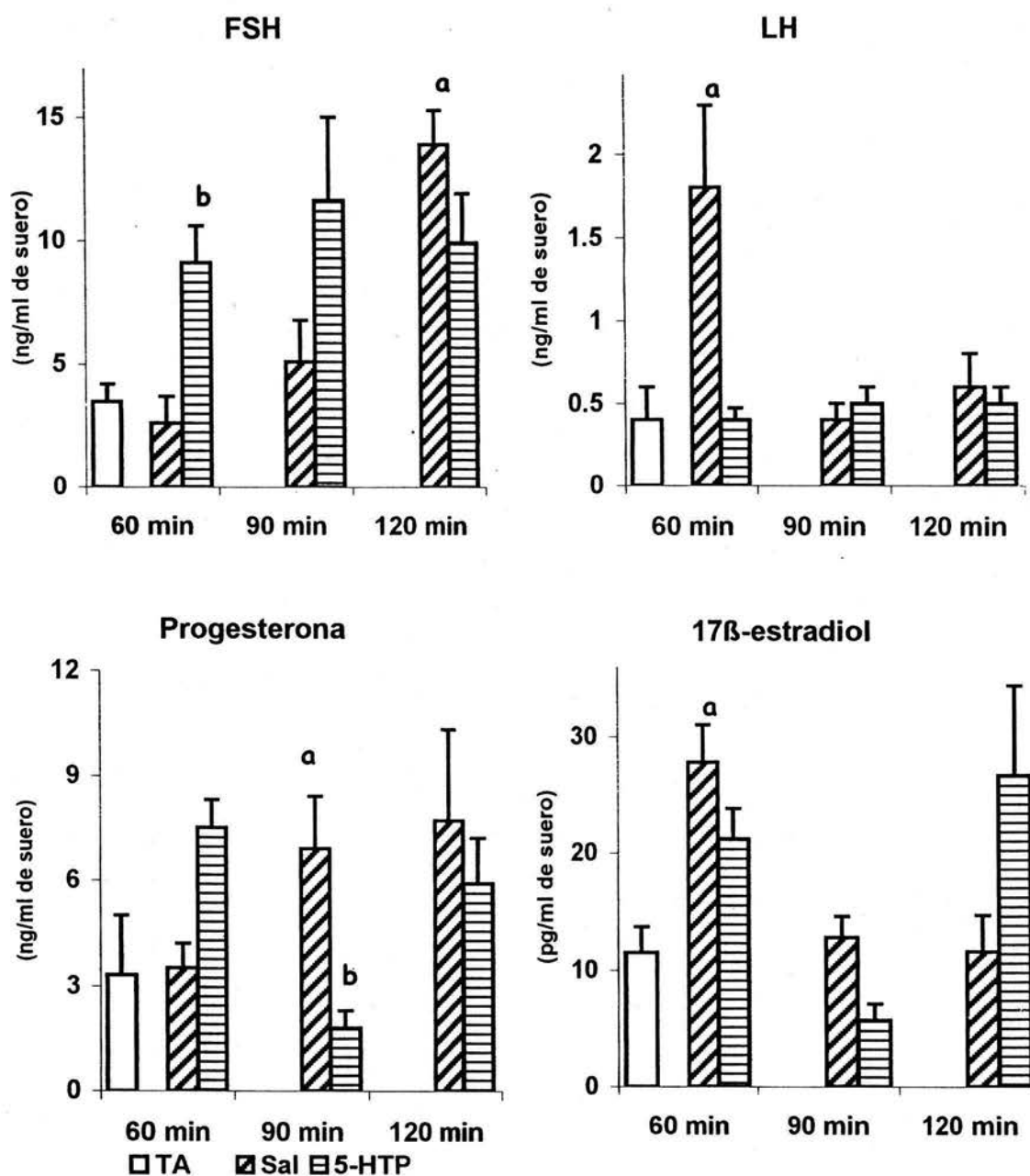
La microinyección de 5-HTP en el núcleo medial del rafé resultó en el incremento en la concentración de FSH siendo significativo cuando los animales fueron sacrificados a los 60 minutos después de la estimulación. En cambio, la concentración de LH no se modificó, excepto en aquellos animales sacrificados 60 minutos después de la operación (Figura 20).

b) Concentraciones en suero de progesterona y 17 β -estradiol

En comparación con el grupo testigo absoluto, la microinyección de solución salina en el núcleo medial del rafé no modificó la concentración de progesterona. La concentración de estradiol fue mayor en los animales sacrificados 60 minutos después de la inyección (Figura 20).

En los animales con estimulación del núcleo medial del rafé inducida por la inyección de 5-HTP, sacrificados a los 60 minutos la concentración sérica de progesterona aumento significativamente y a los 90 minutos después de la inyección

este evento se revirtió. Mientras que, la concentración de 17β -estradiol disminuyó en animales sacrificados 90 minutos después de la operación (Figura 20).



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA; b, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo Sal (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 20. Media \pm e.e.m. de la concentraciones (ng/ml) de la hormona estimulante del fólculo (FSH), luteinizante (LH), progesterona y 17β -estradiol (pg/ml) en el suero de ratas testigo absoluto (TA), o con inyección de solución salina (Sal) o con 5-hidroxitriptofano (5-HTP, $20 \mu\text{g}/2.5\mu\text{l}$) en el núcleo medial del raqué y sacrificadas a los 60, 90 ó 120 minutos después de la inyección.

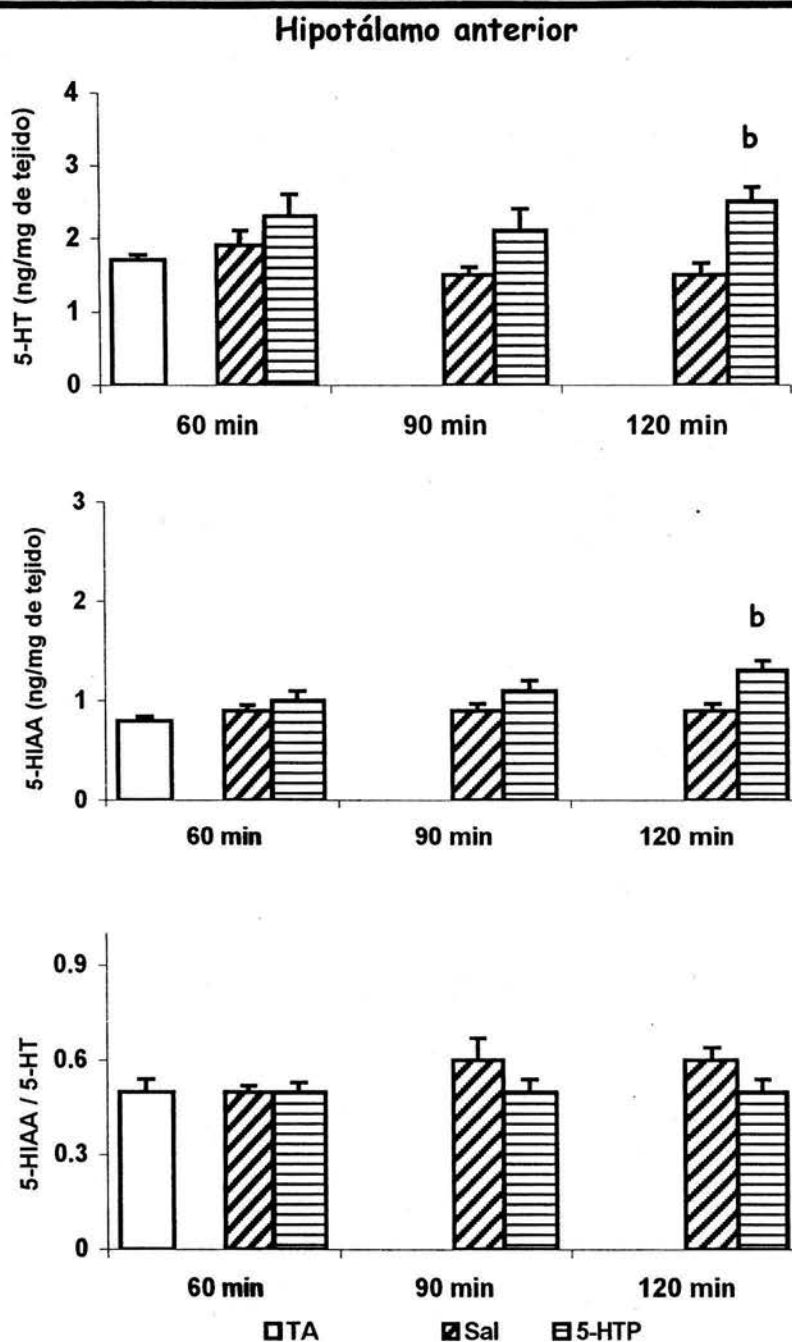
c) Concentraciones en el hipotálamo de serotonina, noradrenalina y dopamina

En los animales que recibieron solución salina en el núcleo medial del rafé no se modificó la concentración de 5-HT y del ácido 5-HIAA en las tres regiones del hipotálamo en comparación con el grupo de animales testigo absoluto (Figuras 21, 22 y 23). Sin embargo, en el hipotálamo medio la relación [5-HIAA]/[5-HT] fue menor (Figura 21). En el hipotálamo posterior la concentración de 5-HIAA se incrementó a los 120 minutos después de la estimulación (Figura 23).

En relación con el grupo de animales con solución salina, en los animales con estimulación del núcleo medial, la concentración de serotonina aumentó significativamente en el hipotálamo anterior (Figura 21), mientras que, en el hipotálamo posterior la concentración de 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] fue mayor (Figura 23).

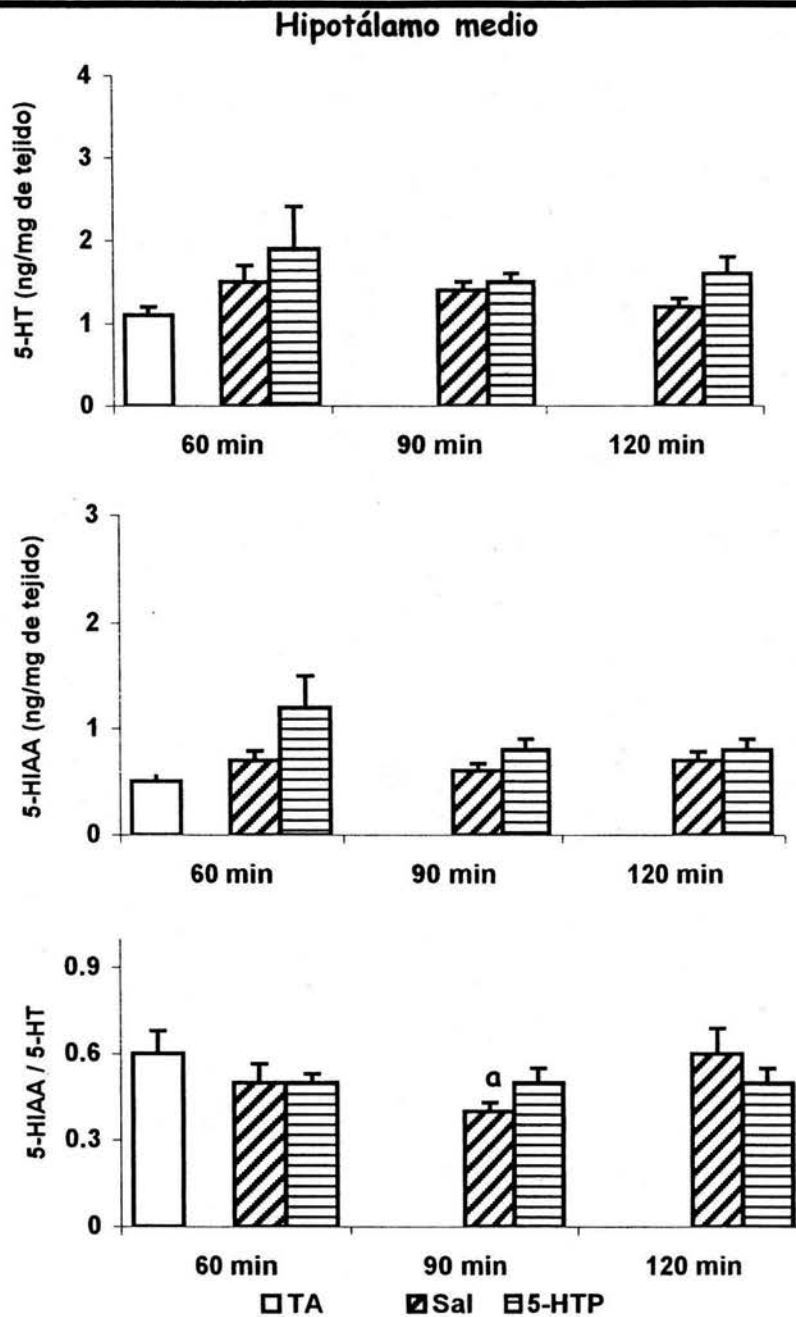
En el hipotálamo anterior y posterior de los animales con microinyección de solución salina en el núcleo medial del rafé, no se presentaron cambios significativos en la concentración de NA y MHPG en comparación a los animales testigo absoluto. Sin embargo, en el hipotálamo medio la concentración de NA fue mayor (2.2 ± 0.1 vs 1.4 ± 0.1 , $p < 0.05$) y de la relación [MHPG]/[NA] se comportó de manera inversa en los animales que fueron sacrificados 90 minutos después de la inyección (0.3 ± 0.05 vs 0.7 ± 0.1 , $p < 0.05$). La concentración de DA en el hipotálamo anterior y fue mayor a los 120 minutos de la microinyección (0.5 ± 0.1 vs 0.2 ± 0.04 , $p < 0.05$) y en el hipotálamo posterior disminuyó de manera significativamente (0.5 ± 0.1 vs 2.1 ± 0.7 , $p < 0.5$).

En comparación con el grupo tratado con solución salina, la concentración de NA y DA en las tres regiones del hipotálamo no se modificó en los animales que con estimulación química del núcleo medial del rafe. Sin embargo, en el hipotálamo anterior de los animales tratados con 5-HTP sacrificados 120 minutos después de inyección, la concentración de MHPG disminuyó (0.5 ± 0.06 vs. 0.5 ± 0.07 , $p < 0.05$).



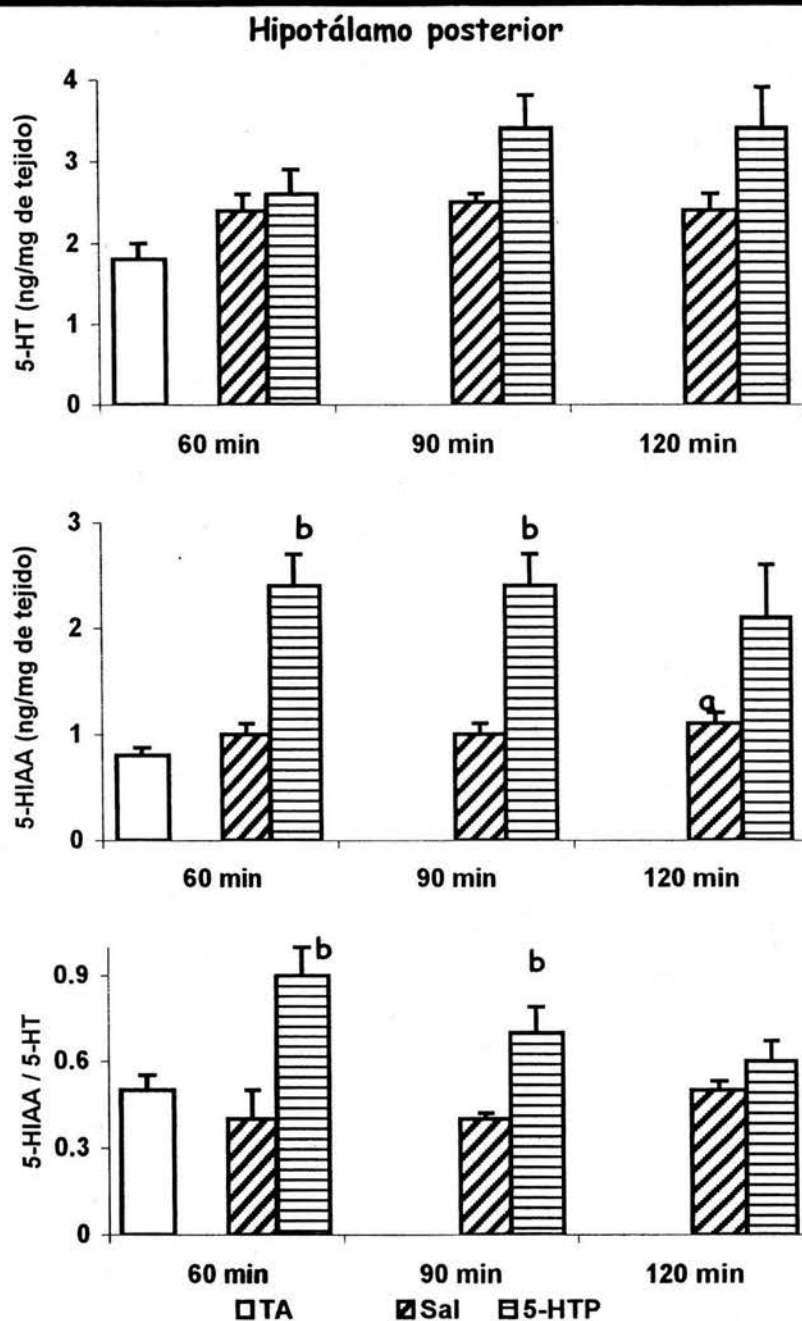
b, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo Sal (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 21. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina (Sal) o 5-hidroxitriptofano (5-HTP, 20 μ g/2.5 μ l) en el núcleo medial del rafé y sacrificadas a los 60, 90 ó 120 minutos después de la inyección.



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

Figura 22. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo medio de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina (Sal) o 5-hidroxitriptofano (5-HTP, 20 μ g/2.5 μ l) en el núcleo medial del rafé y sacrificadas a los 60, 90 ó 120 minutos después de la inyección.



a, $p < 0.05$ vs. grupo TA; b, $p < 0.05$ vs. grupo, respectivo Sal (ANDEVA seguida de prueba de Tukey).

Figura 23. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo posterior de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina (Sal) o 5-hidroxitriptofano (5-HTP, 20 μ g/2.5 μ l) en el núcleo medial del rafé y sacrificadas a los 60, 90 ó 120 minutos después de la inyección.

Analizados en conjunto, los resultados obtenidos en este experimento permiten pensar que en el animal prepúber, la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del rafe, modula de manera estimulante los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de la FSH. El hecho de que no se modificara la concentración de LH en los animales con estimulación del NMR podría ser un indicador de que la información serotoninérgica que proviene de este núcleo no participa en la regulación de la secreción de LH. Estos datos no concuerdan con lo reportado por otros autores en el animal adulto (Barosfky 1979; Morello y col., 1989). Además, en diversos estudios experimentales se ha mostrado que el sistema serotoninérgico participa en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, de manera diferente tanto en el animal adulto y como en el prepúber (Moguilevsky y Wuttke, 2001).

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos llevan a pensar que en el animal prepúber la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR participa de manera estimulante en la modulación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la primera ovulación y las funciones del ovario, vía el sistema noradrenérgico, mientras que el NMR ejerce un efecto estimulante sobre la regulación de la secreción de la FSH.

El incremento en el peso del útero observado en los animales con operación simulada y autopsiados seis días post-operación no puede ser explicado por el incremento en la secreción del estradiol, que es el factor primordial que regula el crecimiento del útero (Steinetz, 1978), dado que en estos animales la concentración de dicha hormona fue menor. Estos resultados nos llevan a pensar que el incremento en el peso del útero puede atribuirse a la acción que ejerce la progesterona y otros factores como son el factor de crecimiento semejante a la insulina tipo I (IGF-I), tipo II y el epidermal (EGF, por sus siglas en inglés). Además, en el útero se ha mostrado la expresión de los receptores a IGF-I, dicho factor estimula la división celular en varios tejidos y el EGF tiene efectos similares a los estrógenos sobre el crecimiento del órgano (Brenner y Slayden, 1994). Es posible que la estimulación de dichos factores y el incremento en la concentración de P₄ sean el resultado del estrés inducido por la anestesia, la sección de vías involucradas en la secreción de dichos factores y como consecuencia incremento en el peso del útero.

Dado que el animal prepúber no posee cuerpos lúteos (Castro y col., 2001), suponemos que la mayor producción de progesterona observada en los animales con

operación simulada sacrificados desde los cuatro días se origina en la glándula adrenal. En la rata hembra adulta se ha mostrado que la adrenalectomía reduce en un 50% la concentración de progesterona (Barco y col., 2003). Es poco probable que la disminución en la concentración de progesterona observada en los animales con operación simulada sacrificados dos días después sea consecuencia del estrés inducido por la anestesia o la manipulación quirúrgica, dado que se ha mostrado que en el animal en situaciones de estrés se incrementa la secreción de la hormona adrenocorticotrófica, corticoides y progesterona (Ramaley, 1979; Welses y Jhonson, 1981).

Sin embargo no se puede descartar esta posibilidad dado que el estrés puede modificar las funciones reproductivas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Rivier y Rivest, 1991). La manipulación manual del zorro azul hembra preñada resulta en el incremento en la concentración de corticoides y disminuye la esteroidogénesis ovárica (progesterona y estradiol) en los fetos hembra (Osadchuk, 2001 y 2003). Por lo que nosotros sugerimos que la disminución en la concentración de estradiol observada en los animales con operación simulada del NDR es el resultado de la modificación en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal inducido por el estrés.

Los cambios en la producción de progesterona y estradiol observados en los animales con operación simulada no pueden ser explicados por una menor secreción de las gonadotropinas, las cuales regulan la esteroidogénesis en la gónada (Gore-Langton y Armstrong, 1994), dado que en estos animales no se observan cambios en la concentración de FSH y LH. Por ello, una posible explicación a la disminución en la concentración en suero de progesterona y estradiol sería el resultado de la sección

de fibras involucradas en los mecanismos que regulan la secreción de las hormonas esteroides al introducir la aguja de microinyección. Esta idea es apoyada por las evidencias que muestran que la lesión de la sustancia gris periacueductal induce la hipertrofia de la glándula adrenal (Reissenweber y col., 1967).

El menor peso de los ovarios en los animales con lesión a los diez días después de realizar la lesión es explicado por un menor crecimiento folicular, debido a la disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo. Se ha mostrado que el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico son regulados por las gonadotropinas, factores de crecimiento y esteroides ováricos (Gore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Roy, 1994; Hillier, 1944). Es posible que a falta de la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR, la concentración de gonadotropinas fue insuficiente para mantener el crecimiento folicular. Esta idea es apoyada por las evidencias que muestran que la lesión química del NDR disminuye la concentración de FSH y el número total de folículos en el primer estro vaginal (Monroy y col., 2000). Sin embargo, el hecho de que no se haya modificado la concentración de las gonadotropinas en estos animales permite pensar que el sistema serotoninérgico del NDR altera la respuesta del ovario a las gonadotropinas por una vía neural que llega al ovario.

Domínguez y col. (2003) mostraron que en el animal prepúber con lesión térmica del núcleo NDR la sección del nervio ovárico superior interrumpe el bloqueo de la ovulación inducido por la lesión. Además, Ayala y col., (1994) observaron que la lesión parcial del NDR aumenta el número de ovocitos liberados por el ovario ipsilateral a la lesión y en el ovario contralateral a la lesión aumenta la ovulación. Sin embargo, hasta el momento no se ha reportado que la gónada reciba inervación

serotoninérgica y que exista una comunicación neural directa entre el ovario y el NDR. En conjunto, estos resultados permiten apoyar la idea de que la información neural que proviene del NDR modifica la respuesta del ovario a las gonadotropinas de manera indirecta, al modular una vía que llegue al ovario y regule sus funciones como son el nervio ovárico superior, nervio vago y plexo ovárico.

La disminución en la concentración de hormonas esteroides ováricas en los animales con lesión del NDR es un indicador de que el sistema serotoninérgico regula de forma directa el proceso de esteroidogénesis. En apoyo a esta interpretación, se ha mostrado que en la rata adulta la administración de ketanserina (bloqueador de los receptores a serotonina del tipo 5-HT₂) por vía oral o directamente a folículos preovulatorios mantenidos *in vitro*, disminuye la concentración de estradiol en el plasma o en el medio de cultivo (Tanaka y col., 1993). Estos resultados apoyan la teoría que la serotonina estimula directamente el proceso de esteroidogénesis en el ovario.

La disminución en el número de folículos totales, tanto pequeños como medianos, así como incremento en la incidencia de atresia observada en los ovarios de los animales con lesión química del NDR no puede ser explicado en función de la disminución en la secreción de FSH y LH, ya que en estos animales no se observaron cambios en la concentración de estas gonadotropinas. Por ello, se postula que el menor crecimiento y diferenciación del folículo ovárico en los animales con lesión del NDR es debido principalmente a la falta de información serotoninérgica que se origina en el NDR, lo que se traduce posiblemente en la modificación de alguna vía neural que llegue al ovario y que regule su función como son el nervio ovárico superior, plexo ovárico y nervio vago (Figura 24).

Gerendai (2000), propone la existencia de vías de comunicación neural entre el ovario y algunas regiones del SNC. Estudios que emplean técnicas histoquímicas muestran que el ovario se encuentra innervado por los sistemas noradrenérgico, peptidérgico y colinérgico. Esta innervación llega al estroma ovárico, a las células del tejido muscular liso que rodea a la teca externa de los folículos primordiales y en desarrollo, al tejido intersticial y están presentes a lo largo de los vasos sanguíneos que rodean al folículo ovárico (Burden, 1978).

Hasta el momento no se ha demostrado que el ovario reciba innervación de tipo serotoninérgica, pero se ha sugerido que el origen de la serotonina ovárica son los mastocitos y las plaquetas o la síntesis *de novo* (células no foliculares) (Krishna y Terranova, 1985). En diversos estudios se ha sugerido que 5-HT participa en la regulación de los diferentes mecanismos que regulan las funciones del ovario, como son la actividad contráctil de las células musculares que rodean al folículo preovulatorio (Talbot y Schoreder, 1982), el control del flujo sanguíneo, la presión intrafolicular, el proceso inflamatorio que precede a la ruptura del folículo facilitando la ovulación (Schmidt y col., 1988) y la esteroidogénesis (Tanaka y col., 1993; Terranova y col., 1980). Con base en estos datos es posible pensar que la información neural de tipo serotoninérgica que proviene del NDR actúe como un modulador de una vía que llega a la gónada y regule sus funciones (nervios vago, ovárico y plexo ovárico). Esta idea es apoyada por el hecho de que la médula espinal recibe innervación serotoninérgica principalmente del núcleo del puente y en menor proporción del NDR y NMR (Jacobs y Azmitia, 1992) y el receptor a serotonina tipo 5-HT₃ se localiza el área del bulbo raquídeo en particular en el núcleo del tracto solitario, núcleo motor dorsal del nervio vago y núcleo del tracto espinal del nervio

trigemino, en la capa superior del cuerno dorsal de la médula espinal y en neuronas periféricas como el ganglio cervical, el cordón espinal y el nervio vago (inervación que llega al ovario) (Kia y col., 1995; Kidd y col., 1993).

La lesión del NDR no eliminó completamente la presencia de serotonina en las tres regiones del hipotálamo, por lo que la amina cuantificada en estas áreas se origina en el núcleo remanente, ya que se ha mostrado que las fibras serotoninérgicas que provienen del NMR inervan el área preóptica, el área preóptica media, la eminencia media, el núcleo ventromedial y el área hipotalámica posterolateral (Van de Kar y Lorens, 1979). Esa posibilidad es apoyada por las modificaciones en la concentraciones de 5-HT y 5-HIAA observadas en el hipotálamo de los animales con estimulación del NMR. El incremento en la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior de los animales con estimulación del NMR concuerda con evidencias bioquímicas y morfológicas que muestran que la inervación serotoninérgica proveniente del NMR inerva al hipotálamo anterior (área preóptica anterior, núcleo supraquiasmático y área preóptica media) (Van de Kar y Lorens, 1979).

Otra fuente de serotonina pudiera ser aportada por las neuronas localizadas en el propio hipotálamo, ya que se ha sugerido que en el núcleo ventromedial existen neuronas productoras de serotonina (Takeuchi, 1988). Además, en estudios empleando trazadores anterógrados y retrógrados, se han identificado neuronas serotoninérgicas en el hipotálamo lateral (Celda, 2002; Peyron y col., 1998).

El hecho de que la administración del propranolol en los animales con lesión del NDR restauró la ovulación, nos llevó a pensar que la inervación serotoninérgica

que proviene del núcleo dorsal modula de manera estimulante las funciones del ovario (ovulación y el proceso de esteroidogénesis), vía el sistema noradrenérgico. En estudios anatómicos se ha mostrado que el LC recibe inervación serotoninérgica del NDR (McRae-Degueurce y col., 1981, 1982; Pickel y col., 1977; Sakai y col., 1977). Además, en dicho núcleo se ha observado la expresión del ARNm que codifica para el receptor a serotonina del tipo 5-HT_{2c} (Wright y Jennes 1993) y también posee neuronas noradrenérgicas (Brown, 1994). Estudios experimentales han mostrado que el LC regula de manera inhibitoria la liberación preovulatoria de la LH (Dotti y Taleisnik, 1982, 1984; Morello y Taleisnik, 1988; Martins-Afférrri y col., 2003).

Según Maekawa y col. (1999), la estimulación de los receptores a serotonina del tipo 5-HT_{2A/2C} en ratas adultas con lesión térmica del NDR provoca la secreción de LH y la ovulación. Sin embargo, Kordon y col. (1994), postula que el efecto inhibitorio que ejerce la noradrenalina sobre la secreción de LH en ratas ovariectomizadas, no se ha mostrado en ratas intacta y estos efectos "sólo son observados después del estímulo eléctrico de algunas vías noradrenérgicas, por la administración intraventricular de noradrenalina o de agonistas noradrenérgicos. Sin embargo, en cada caso cuando se administra el propranolol a ratas castradas o castradas con reemplazo hormonal, no interfirió con la liberación de LH, sino que la potencializó. Por lo tanto, la inhibición en la secreción de LH que ejerce el sistema noradrenérgico vía los receptores β -adrenérgicos no parece ocurrir durante estos estados fisiológicos".

Diversas evidencias experimentales han mostrado que el propranolol también bloquea los receptores 5-HT₁/5-HT₂ (Alexander y Wood 1987; Tinajero y col.,

1993). El hecho de que se restablezca la ovulación en los animales tratados con propranolol, lesionados previamente del NDR, puede ser explicado por diferentes mecanismos: 1) el bloqueo de algunas vías noradrenérgicas que participan en la regulación de la ovulación, 2) por la disminución en la actividad serotoninérgica en el hipotálamo inducida por el tratamiento con propranolol, 3) o por la combinación de ambos efectos (Figura 25).

Dado que la administración de isoproterenol en los animales con lesión del NDR también restauró la primera ovulación, permite pensar que la falta de información serotoninérgica del NDR modifica otra vía noradrérgica involucrada en la regulación de la ovulación, como la región del bulbo raquídeo y la formación reticulada que en vía fibras noradrenérgicas al hipotálamo anterior donde se sabe que participa en la en la regulación de la secreción de las gonadotropinas por la activación de las neuronas GnRHérgicas (Kordón y col., 1994; Martins-Afférri y col., 2003), sin descartar la posibilidad de que el isoproterenol al estimular los receptores β -adrenérgicos presentes en las células de la teca (Krishna y col., 2001) y granulosa del folículo ovárico (Ojeda y col., 1990), dichos receptores modifiquen la respuesta del folículo a las gonadotropinas.

El núcleo del rafé inerva células catecolaminérgicas localizadas en el bulbo raquídeo (A1/C1), la formación reticulada (A6 y A7) y en el complejo del tracto solitario (A2/C2) (Törk, 1985; Nicholas y Hancock, 1988, 1989 y 1990). La formación reticulada recibe inervación serotoninérgica de los grupos caudales del núcleo del rafé y de los grupos celulares B3, B6, B7, B8 y B9 (Beitz, 1982; Zeng y col., 1991). Las neuronas noradrenérgicas del grupo A1 están situadas en la porción ventrolateral del bulbo raquídeo y envía fibras nerviosas ascendentes que viajan por

el haz tegmental ventral a la región de área preóptica del hipotálamo anterior (Brown, 1994) y el área preóptica medial recibe inervación noradrenérgica principalmente de los grupos A1 y A2 (Day y col., 1980).

En diversos estudios experimentales se ha mostrado que en la rata ovariectomizada con remplazo hormonal, la estimulación eléctrica del área preóptica media y de A1 resultan en la liberación de la LH (Gitler y Barraclough, 1988). Además, la lesión bilateral de la región lateral del bulbo raquídeo, bloquea la liberación de la LH y FSH. En estos animales, la capacidad ovulatoria se recupera con la inyección intraventricular de NA o la estimulación eléctrica del núcleo supraquiasmático (Crowley y Terry, 1981). Estos resultados llevan a sugerir que la liberación preovulatoria de las gonadotropinas está regulada por los efectos estimulantes de la noradrenalina de las células A1 que inervan al área preóptica hipotalámica anterior (Figura 25).

Por otra parte, Bergen y Leung (1986) y Leung y col. (1982) mostraron que en la rata ovariectomizada con remplazo hormonal (tratadas con estrógenos y progesterona) la administración intraventricular de fenileprina (agonista de los receptores α -adrenérgicos) o isoproterenol (agonista de los receptores β -adrenérgicos) inhibe la secreción preovulatoria de la LH, lo que hace pensar que el efecto inhibitorio que ejerce NA sobre la secreción de la LH puede ser por medio de la activación de los receptores α y β -adrenérgicos.

Es posible que esta diferencia en los resultados sea consecuencia de utilizar modelos experimentales diferentes y que los efectos inhibitorios de la noradrenalina sean el resultado de una sobreestimulación del sistema y de la

participación diferencial que ejercen los diferentes grupos de células noradrenérgicas en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

En conjunto estos resultados nos permiten pensar que el hecho de que se restablezca la ovulación en los animales con lesión del NDR por tratamiento con propranolol o isoproterenol depende del origen de la información noradrenérgica que se modifique, por lo que el efecto estimulante que ejerce la información serotoninérgica del NDR en los mecanismos que regulan la primera ovulación sería por sus efectos sobre el sistema noradrenérgico, posiblemente del LC y del bulbo raquídeo (Figura 25).

El incremento en la concentración de FSH en los animales con estimulación del sistema serotoninérgico que se origina en el NMR inducida por la microinyección de 5-HTP, precursor inmediato en la síntesis de serotonina, posiblemente es el reflejo de la modificación en la frecuencia de los pulsos de secreción de GnRH y, por consecuencias de las gonadotropinas. Evidencias experimentales muestran que la secreción de la GnRH es regulada directamente por el sistema serotoninérgico. Estudios anatómicos muestran que existe una comunicación sináptica entre la terminal nerviosa serotoninérgica y el soma de la neurona GnRHérgica en el área preóptica, y entre las terminales nerviosas de ambas neuronas en la eminencia media (Jennes y col., 1982).

La idea de que el sistema serotoninérgico regula la secreción de FSH ha sido postulada previamente por Monroy col. (2003) y por Justo y col., (1993) quienes encontraron que en la rata hembra de 30 días y en el macho prepúber y adulto la

administración sistémica de 5-HTP incrementa la secreción de FSH y acompañado del incremento en las concentraciones de 5-HT del 5-HIAA en el hipotálamo.

Al parecer, la información serotoninérgica del NMR participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas, ya que la estimulación de este núcleo resultó en el incremento en la concentración de FSH. Sin embargo, esta idea no concuerda con lo reportado por Morello y col. (1989, 1990) y Ruzsas y col. (1982) quienes postularon que dicho núcleo regula de manera inhibitoria la secreción de la LH; y por Barofsky (1975) y Van de Kar y col. (1980) quienes utilizan otros modelos experimentales sugieren que no participa en la regulación de dichos procesos.

En el animal prepúber de 30 días de edad la lesión química del NMR no modifica la primera ovulación ni las concentraciones séricas de FSH y LH, por lo que podemos sugerir que el NMR no participa en la modulación de su secreción (Monroy y col., 2000). En otro modelo experimental, Meyer (1978) mostró que en el animal de 30 días la microinyección de 5,7-hidroxitriptamina en el NMR bloquea la ovulación inducida por la gonadotropina de suero de yegüa preñada y disminuye la recaptura de serotonina en la eminencia media, lo que sugiere que la integridad de las proyecciones serotoninérgicas que se originan en los núcleos del rafe son esenciales en los mecanismos que regulan la ovulación.

Una posible explicación a las diferencias observadas en los resultados obtenidos en este estudio a lo reportado por otros autores se deba a que la información que se origina en el NMR participa de manera diferencial en la regulación de la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación durante el

desarrollo del animal. Al respecto, se ha mostrado que el sistema serotoninérgico participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de la GnRH y LH al inicio de la etapa prepuberal, mientras que este efecto desaparece al final de esta etapa y es de tipo inhibitorio en el animal adulto (Arias y col., 1990; Moguilevsky y col., 1985; Moguilevsky y Wuttke, 2001). Es posible pensar que al final de la etapa juvenil (30 días de edad), la información serotoninérgica que proviene del NMR participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, en particular de la FSH; mientras que en la etapa adulta ejerce un efecto inhibitorio en la regulación de la secreción de LH y en la ovulación (Figura 26).

El hecho que no se observaran cambios en la concentración de serotonina en el hipotálamo medio posiblemente se deba que esta área del hipotálamo recibe un menor aporte de fibras serotoninérgica provenientes del núcleo medial. Estudios bioquímicos muestran que la eminencia media y el núcleo arcuato (hipotálamo medio), principalmente, reciben inervación serotoninérgica proveniente del NDR (Villar y col., 1984), mientras que el NMR inerva el hipotálamo anterior (Van de Kar y Lorens, 1979).

En suma, los resultados obtenidos en este estudio apoyan la idea de que en el animal prepúber existen dos sistemas serotoninérgicos funcionales que participan de manera estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el eje hipotálamo-hipófisis-ovario; el NDR participaría de manera estimulante en la regulación de la secreción de FSH y las funciones del ovario, mientras que el NMR regula de manera estimulante la secreción de FSH pero no de LH.

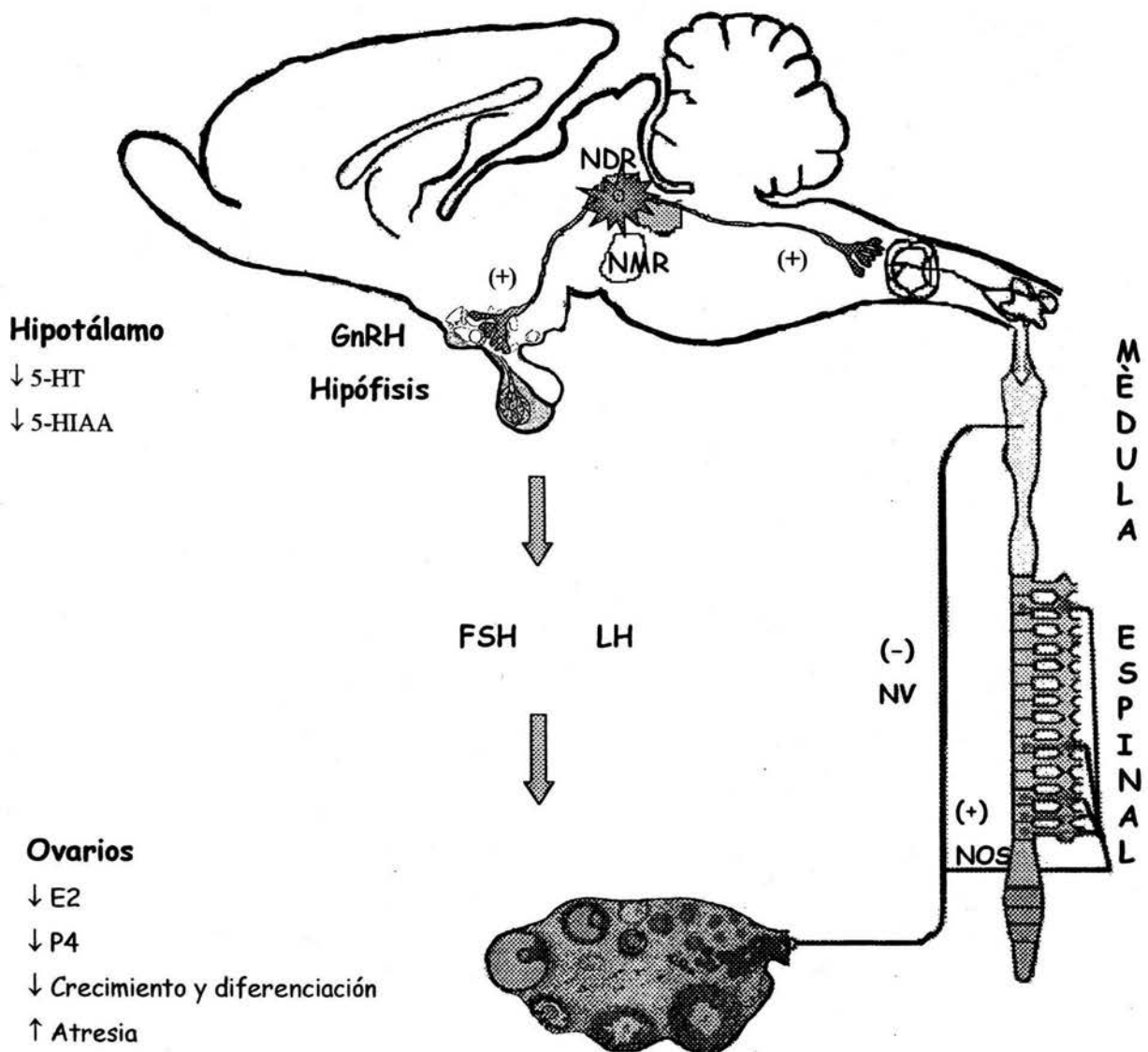


Figura 24. Modelo propuesto de la posible participación de la inervación serotoninérgica que se origina del núcleo dorsal del raquídeo en el animal de 30 días de edad con lesión del núcleo dorsal. Las flechas (↑ o ↓) indican incremento o disminución respectivamente; (+), estimulante; (-), inhibitorio; 5-HT, serotonina; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético; NDR, núcleo dorsal del raquídeo; NMR, núcleo medial del raquídeo; GnRH, hormona liberadora de las gonadotropinas; FSH, hormona estimulante del folículo; LH, hormona luteinizante; P₄, progesterona; E₂, 17β-estradiol; NV, nervio vago; NOS, nervio ovárico superior.

Falta página

N° 93

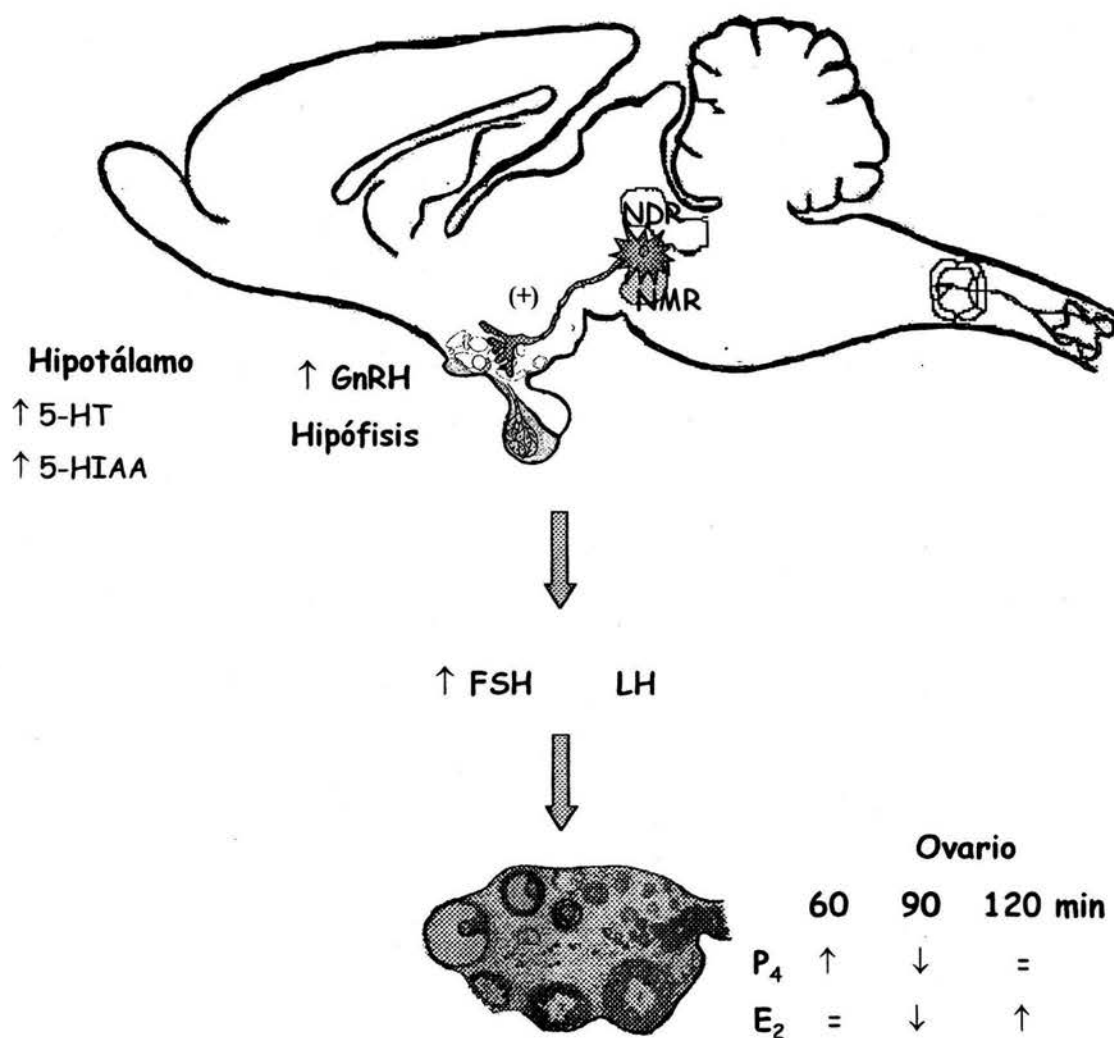


Figura 26. Modelo propuesto de la posible participación de la innervación serotoninérgica que se origina del núcleo medial del rafé en el animal de 30 días de edad con lesión del núcleo dorsal. Las flechas (↑ o ↓) indican incremento o disminución respectivamente; (+), estimulante; (-), inhibitorio; 5-HT, serotonina; 5-HIAA, ácido 5-hidroxiindolacético; NDR, núcleo dorsal del rafé; NMR, núcleo medial del rafé GnRH, hormona liberadora de las gonadotropinas; FSH, hormona estimulante del folículo; LH, hormona luteinizante; P₄, progesterona; E₂, 17β-estradiol.

CONCLUSIONES

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

- Las aferencias serotoninérgicas originadas en el núcleo dorsal del rafé no participa en la secreción tónica de las gonadotropinas.
- En el animal prepúber la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de progesterona y 17β -estradiol.
- La información serotoninérgica que proviene del núcleo dorsal del rafé es esencial en el mantenimiento del crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico.
- En el animal prepúber la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé participa de manera estimulante en los mecanismos que regulan las funciones del ovario.
- El sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo dorsal del rafé participa de manera estimulante en los mecanismos que regulan la primera ovulación.

- El efecto estimulante que ejerce el sistema serotoninérgico en los mecanismos que regulan la primera ovulación, es mediado por el sistema noradrenérgico.
- En el animal prepúber la innervación serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del rafe participa de manera estimulante la secreción de FSH.
- En el animal prepúber la innervación serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del rafe parece no participar en la regulación de la secreción de la LH.

PERSPECTIVAS

De los resultados obtenidos en este estudio surgen varias interrogantes, algunas de las cuales se plantean a continuación.

1. ¿Existe realmente la comunicación directa entre los núcleos del rafé y el ovario, o es por medio de una vía neural indirecta si es así cuál(es) es(son) la(s) vía (s)?
2. ¿Cuáles son los mecanismos que se modifican en el ovario por la falta de información serotoninérgica del núcleo dorsal del rafé?
3. ¿La falta de inervación serotoninérgica modifica el aporte de péptidos y neurotransmisores que transcurren por la inervación que llega al ovario?
4. ¿Cuál es el mecanismo por el que el sistema noradrenérgico restablece la ovulación en los animales con lesión del núcleo dorsal del rafé?
5. ¿La información serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del rafé participa en los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas en el animal prepúber?
6. ¿La estimulación del sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo medial del rafé modifica a los sistemas de aminoácidos excitadores en el hipotálamo que participan en la regulación de secreción de las gonadotropinas?

7. ¿La información serotoninérgica que se origina en los núcleo dorsal y medial del rafe participan de manera diferencial o es complementaria en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas y la primera ovulación en el animal prepúber?

REFERENCIAS

- Adams L.A., Steiner R.A.** (1988). Puberty. *Rev. Reprod. Biol.*, 10: 1-52.
- Adell A., Celada P., Abellán MT., Argigas F.** (2002). Origin and functional role of the extracellular serotonin in the midbrain raphe nuclei. *Brain Res.* 39:154-180.
- Alexander, B.S.; Wood, M.D.** (1987). Stereoselective blockade of central [3H]5-hydroxytryptamine binding to multiple sites (5-HT1A, 5-HT1B and 5-HT1C) by mianserin and propranolol. *J. Pharm. Pharmacol.*, 39: 664-666.
- Andrews WW., Ojeda SR.** (1981) (a). A quantitative analysis of the maturation of steroid negative feedbacks controlling gonadotropin release in the female rat: Transition from an androgenic to a predominantly estrogenic control. *Endocrinology*, 108: 1313-1320.
- Andrews WW., Ojeda SR.** (1981) (b). The maturation of estradiol-negative feedback in female rats: evidence that the resetting of the hypothalamic "gonadostat" does not precede the first preovulatory surge of gonadotropins. *Endocrinology*, 109: 2022-2031.
- Anesetti G., Lombide P., D'Albora H., Ojeda SR.** (2001). Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell Tissue Res.*, 306: 231-237.
- Arendash GW., Gallo RV.** (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., Szwarcfarb B., de Rondina D.C., Carbone S., Sverdlík R., 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 prepubertal and peripubertal female rats. *Brain Res.*, 523: 57-61.
- Ayala ME., Monroy J., Morales L., Castro ME., Domínguez R.** (1998). Effects of a lesion in the dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period of the female rat, on puberty. *Brain Res. Bull.*, 47: 211-218.
- Ayala ME., Rosas P., Domínguez R.** (1994). Different effects of unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation. *Brain Res. Bull.*, 34: 27-30.
- Azmitia EC., Whitaker-Azmitia PM.** (2000). Development and adult plasticity of serotonergic neurons and their target cells. En: **Serotonergic Neurons and 5-HT Receptors in the CNS.** HG. Baumgarten, M. Göthert (Edits.). Springer Press. 1-39.
- Azmitia, EC., Segal M.** (1978). An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat. *J. Comp. Neur.*, 179: 641-668.
- Baraban JM., Aghajanian GK.** (1981). Noradrenergic innervation of serotonergic neurons in the dorsal raphe: demonstration by electron microscopic autoradiography. *Brain Res.*, 204: 1-11.
- Barco AI., Flores A., Chavira R., Damián-Matsumura P., Domínguez R., Cruz ME.** (2003). Asymmetric effects of acute hemiovariectomy on steroid hormone secretion by the *in situ* ovary. *Endocrine*, 21: 209-215.
- Barofsky AL.** (1975). Progesterone-induced luteinizing hormone release in oestrogen-primed ovariectomized rats after destruction of mid-brain inputs to suprachiasmatic nuclei. *J. Endocrinol.*, 66: 285-286.
- Barofsky AL.** (1979). Median raphe stimulation and sham procedures inhibit the LH surge. *Neuroendocrinology*, 28: 358-370.

- Baumgarten HG., Grozdanovic A.** (2000). Anatomy of central serotonergic projection systems. En: **Serotonergic Neurons and 5-HT Receptores in the CNS.** HG. Baumgarten, M. Göthert (Edits.). Springer Press, Alemania, 41-89.
- Beudet A., Descarries L.** (1981). The fine structure of central serotonin neurons. *J. Physiol., Paris*, 77: 193-203.
- Becu-Villalobos D., Lacau-Menguído IM.** (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, 40: 1-17.
- Beitz AJ.** (1982). The sites of origin brain stem neurotensin and serotonin projections to the rodent nucleus raphe magnus. *J. Neurosci.*, 7: 829-42.
- Bergen H, Leung PC.** (1986). Suppression of progesterone-induced gonadotropin surge by adrenergic agonists in estrogen-primed ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 43:397-403.
- Brenner RM., Slayden OD.** (1994). Cyclic changes in the primate oviduct and endometrial. En: **The Physiology of Reproduction.** E. Knobil y JD. Neill. (Edits.). Vol. 1, segunda edición. Raven Press. New York, EUA, 541-569.
- Brown RE.** (1994). Neurotransmitter. En: **An introduction to Neuroendocrinology.** Cambridge University Press, Inglaterra, 56-87.
- Burden HW.** (1980). Ovarian innervation. En: **The vertebrate ovary. Comparative Biology.** RE. Jones (Edits.) Plenum Press, Nueva York, EUA, 331-360.
- Burden HW.** (1985). The adrenergic innervation of mammalian ovaries En: **Catecolamines as Hormone Regulations.** N. Ben-Jonathan, JM. Bahr, R. Weiner (Edits.). Raven Press, New York. 262-277.
- Burden HW., Lawrence IE Jr.** (1978). Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. *Anat. Rec.*, 190: 233-41.

- Busby WH., Quackenbus GE., Humm J., Youngblood WW., Kizer JS. (1987). An enzyme(s) that converts glutaminyl peptides into pyroglutamylpeptides. *J. Biol. Chem.*, 262: 8532-8536.
- Castro E., Ayala ME., Monroy J., Chavira R., Damián-Matsumura P., Domínguez R. (2001). Changes in monoaminergic activity in the anterior, medium and posterior hypothalamus, gonadotropins levels and ovarian hormones during puberty of the female rat. *Brain Res. Bull.*, 54: 345-252.
- Celda P., Casanovas JM., Paez X., Artigas F. (2002). Control of serotonergic neurons in the dorsal nucleus by the lateral hypothalamus. *Brain Res.*, 932: 79-90.
- Charli J-L., Ponce C., Josep-Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En: *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. R. Domínguez (Editor). UNAM-PORRUA, México, 59-85.
- Chazal G., Ralston HJ. (1987). Serotonin containing structures in the nucleus raphe dorsalis of the cat: and ultrastructural analysis of dendrites, presynaptic dendrites, and axon terminals. *J. Comp. Neurol.*, 259: 317-329.
- Conn M. (1994). The molecular mechanism of gonadotropi-releasing hormone action in the pituitary En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil, JD. Neill (Edits.). Vol. 1., segunda edition. Raven Press, New York, USA, 1815-1832.
- Crowley WR., Terry LC. (1981). Effects of and epinephrine synthesis inhibitor, SKF64139, on the secretion of luteinizing hormone in ovariectomized female rats. *Brain Res.*, 204: 231-235.
- Cruz ME., Chávez R., Domínguez R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Rev. Inv. Clínica*, 38: 167-171.

- D'Albora H., Lombide P., Ojeda SR.** (2000). Intrinsic neurons in the rat. *Cell Tissue Res.*, 300: 47-56.
- Da Prada M., Pieri L., Keller HH., Pieri M., Bonetti EP.** (1978). Effects of 5,6-Dihydroxytryptamine and 5,7-Dihydroxytryptamine on the rat central nervous system after intraventricular or intracerebral application and on blood platelets in vitro. *Ann. NY. Acad. Sci.*, 305: 595-620.
- Dahlström A, Fuxe K.** (1964). Evidence for the existence of monoamine-containing neurons in the central nervous system I. Demonstration of monoamines in cell bodies of brain stem neurons. *Acta Physiol. Scand. Suppl.*, 232: 1-55.
- Davis SF., Derbenev AV., Williams KW., Glatzer NR., Smoith BN.** (2004). Excitatory and inhibitory local circuit input to the rat dorsal motor nucleus of the vagus originating from the nucleus tractus solitarius. *Brain Res.*, 13: 208-217.
- Day TA., Blessing W., Willoughby JO.** (1980). Noradrenergic and dopaminergic projections to the medial preoptic area of the rat. A combined horseradish peroxidase/catecholamine fluorescence study. *Brain Res.*, 193: 543-548.
- Descarries L., Watkins KC., Garcia S., Beaudet A.** (1982). The serotonin neurons in nucleus raphe dorsalis of adult rat: a light and electron microscope autoradiographic study. *J. Comp. Neurol.*, 207: 239-254.
- Dessen CA., Romero C., Hirshfield A., Ojeda SR.** (2000). Nerve growth factors required for early follicular development in the mamalian ovary. *Endocrinology*, 142: 2078-2086.
- Dissen GA., Hill DF., Dess WL., Ojeda SR.** (1993). Neural and neurotrophic control of ovarian development. En: **The ovary**. Adashi EY, Leung PCK (Edits.). Raven Press, New York, EUA, 1-19.
- Döhler KD, Wuttke W.** (1975). Changes with age in levels of serum gonadotropins,

- prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*, 97: 898-907.
- Domínguez R., Figueroa A., Monroy J., Damián-Matsumura P., Ayala ME.** (2003). The section of the superior ovarian nerve (SON) interrupted the blockade of ovulation induced by the lesion of the dorsal raphe nucleus. 36Th Annual Meeting of the Society of the Study of Reproduction, Cincinnati, Ohio, EUA. Abstract 494.
- Dotti C., Taleisnik S.** (1982). Inhibition of the release of LH ovulation by activation of the noradrenergic system. Effect of interrupting the ascending pathway. *Brain Res.*, 249: 281-290.
- Dotti C., Taleisnik S.** (1984). Beta-Adrenergic receptors in the premammillary nucleus mediate the inhibition of LH release evoked by *locus ceruleus* stimulation. *Neuroendocrinology*, 38: 6-15.
- Fink G.** (1988). Gonadotrophin secretion and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Edits.). Raven Press, New York, EUA, 1349-1378.
- Frazer A., Hensler, JG.** (1999). Serotonin. En: **Basic neurochemistry, molecular, cellular and medical aspects**. GJ. Siegel, BW. Agranoff, RW. Albers, PB. Molinoff (Edits.). Raven Press, New York, EUA, 263-292.
- Gerendai A., Halász B.** (1997). Neuroendocrine asymmetry, *Front. Neuroendocrinology*, 18: 354-81.
- Gerendai I., Kocsis K., Halász B.** (2002). Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. *Microscopy research and technique* 59: 474-483.
- Gerendai I., Tóth IA., Boldogkői Z., Medveczky I., Halász B.** (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral

- transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology*, 68: 244-256.
- Gerendai I., Tóth IE., Boldogkői Z., Medveczky I., Halász B. (2000).** CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *J. Auton. Nerv. Syst.*, 80: 40-45.
- Germain BJ., Campbell PS., Anderson JN. (1978).** Role of the serum estrogen-binding protein in the control of tissue estradiol levels during postnatal development of the female rat. *Endocrinology*, 103: 1401-1410.
- Giltler MS., Barraclough CA. (1988).** Stimulation of the medullary A1 noradrenergic system augments luteinizing hormone release induced by medial preoptical stimulation *Neuroendocrinology*, 48: 351-359.
- Gore-Langton RE., Armstrong DT. (1994).** Follicular steroidogenesis and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill. (Edits.). Vol. 1, segunda edición, Raven Press. New York, EUA, 571-611.
- Greenwald GS., Roy SK. (1994).** Follicular development and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill. (Edits.) Vol. , segunda edición, Raven Press, New York, EUA, 629-721.
- Halliday G, Hardin A, Paxinos G. (1995).** Serotonin and Tachykinn systems En: **The Rat Nervous System**. G. Paxinos (Editor). Segunda edición, Academic Press. San Diego, EUA, 929-974.
- Héry M., Laplante E., Kordon C. (1978).** Participation of serotonin in the phasic release of LH. II. Effects of lesions of serotonin containing pathways in the central nervous system. *Endocrinology*, 102: 1009-1025.
- Hillier GS. (1994).** Hormonal control folliculogenesis and luteinization. En: **Molecular Biology of Reproduction System**. JK. Findlay (Editor). Academic Press 1-25.

- Jacobs BL., Azmitia EC. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.*, 72: 165-229.
- Jennes D., Beckman WC., Stumpf WE., Grzanna R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH systems in the septum and hypothalamus. *Exp. Brain Res.*, 46: 331-338.
- Jennes D., Stumpf WE., Tappaz ML. (1983). Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic systems with the GnRH-systems in the septo-hypothalamic area. *Exp. Brain Res.*, 50: 91-99.
- Justo SN., Rossano GL., Szwarcfarb B., Rubio MC., Moguilevsky JA. (1989). Effects of serotonergic system on FSH secretion in male and female rats: evidence for stimulatory and inhibitory actions. *Neuroendocrinology*, 50: 382-386.
- Kerdelhué D., Bojda F., Lesieur P., Pasqualini C., El abed A., Lenoir V., Duillet P., Chiueh C.M., Palkovits M. (1989). Medial eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology*, 49: 176-180.
- Kia HK., Miquel M-C., McKernan RM., Laporte A-M., Lombard M-C., Bourgoin S., Hamon M., Vergé D. (1995). Localization of 5-HT₃ receptor in the rat spinal cord: immunohistochemistry and *in situ* hybridization. *NeuroReport*, 6: 257-261.
- Kidd EJ., Laporte AM., Langlois X., Fattaccini C-M., Doyen C., Lombard M.C., Gozlan H., Hamon M. (1993). 5-HT₃ receptors in the rat central nervous system are mainly located on nerve fibres and terminals. *Brain Res.*, 612: 289-298.
- Klein CM., Burden HW. (1988). Anatomical localization afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letter*, 85: 217-222.

- Köhler C., Steinbusch H.** (1982). Identification of serotonin and non-serotonin-containing neurons of the mid-brain raphe projecting to the entorhinal area and the hippocampal formation. A combined immunohistochemical and fluorescent retrograde tracing study in the rat brain. *Neuroscience*, 7: 951-975.
- Kordon C., Drouvas SV., Martínez de la Escalera EG., Weiner RI.** (1994). En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill. (Edits.) Vol. 1, segunda edición. Raven Press, New York, EUA, 1621-1681.
- Krishna A., Fifai AA., Hubner B., Rother P., Spanel-Borowski K.** (2000). Increase in calcitonin gene related peptide (CGRP) and decrease in mast cells in dehydroepiandrosterone (DHEA)-induced polycystic rat ovaries. *Anat. Embryol.*, 203: 375-382.
- Krishna A., Terranova PF.** (1985). Alterations in mast cell degranulation and ovarian histamine in the proestrous hamster. *Biol. Reprod.*, 32: 1211-1217.
- Lawrence IE. Jr., Burden HW.** (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat. Rec.*, 196: 51-9.
- Leung PC., Arendash GW., Whitmoyer DI., Gorski RA., Sawyer CH.** (1982). Differential effects of central adrenoceptor agonists on luteinizing hormone release. *Neuroendocrinology*, 34: 2007-2014.
- Lunas LG.** (1975). *Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. McGraw-Hill Book, Co., New York, EUA, 21.
- MacLean DB., Lewis SF.** (1984). Axoplasmic transport of somatostatin and substance P in the vagus nerve of the rat, guinea pig and cat. *Brain Res.*, 307: 135-145.
- Maekawa F., Tsukahara S., Tsukamura H., Maeda K-I., Yamanouchi K.** (1999). Prevention of inhibitory effect of dorsal raphe nucleus lesions on ovulation and

- LH surge by 5-HT 2A/2C receptor agonists in female rats. *Neurosc., Res.*, 35: 291-298.
- Martins-Afféri MP., Ferreira-Silva IA., Rodrigues-Franci C., Anselmo-Franci JA. (2003).** LHRH release depends on *locus coeruleus* noradrenergic inputs to the medial preoptic area and median eminence. *Brain Res., Bull.*, 61: 5221-527.
- McRae-Degueurce A., Berod A., Mermet A., Keller A., Chouvet G., Joh TH., Pujol JF. (1982).** Alterations in tyrosine hydroxylase activity elicited by raphe nuclei lesions in the rat *locus coeruleus*: evidence for the involvement of serotonin afferents. *Brain Res.*, 235: 285-301.
- McRae-Degueurce A., Lénger L., Wiklund L., Pujol JF. (1981).** Functional recuperation of the serotonergic innervation in the rat *locus coeruleus*. *J. Physiol. Paris*, 77: 389-392.
- Meyer DC. (1978).** Hypothalamic and raphe serotonergic systems in ovulation control. *Endocrinology*, 103: 1067-1074.
- Moguilevsky JA., Faigon MR., Scacchi P., Szwarcfarb B. (1985).** Effect of serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats. *Neuroendocrinology*, 40: 135-138.
- Moguilevsky JA., Wuttke W. (2001).** Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, 109: 188-95.
- Molliver ME. (1987).** Serotonergic neuronal systems: What their anatomic organization tells us about function. *J. Clin. Psychopharmacol.* 7 Suppl., 6 3s-33s.
- Monroy J., Ayala ME., Damián-Matsumura P., Domínguez R. (2000).** Efecto de la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina en los núcleos dorsal y medial del rafé

- en el inicio de la pubertad y la primera ovulación, XXV Reunión Anual de la Academia de Biología de la Reproducción.
- Monroy J., Morán MJ., Ayala ME., Damián-Matsumura P., Domínguez R.** (2003). La activación del sistema serotoninérgico estimula la secreción de gonadotropinas en ratas prepúberes. C-110, XLVI Congreso Nacional de Ciencias Filológicas.
- Moore RY.** (1981). The anatomy of central serotonin neuron systems in the rat brain. En: **Serotonin Neurotransmission and Behavior**. BL. Jacobs, A. Gelperin. (Edits.). MIT Press, Cambridge, Mass, EUA, 35-71.
- Morello H., Caligaris L., Haymal B., 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., Caligaris L., Haymal B., Taleisnik S.** (1990). Further evidence of an opposite effect of dorsal and median raphe nuclei on the proestrous surge of LH. *Acta Endocrinol. (Copenh)*, 122: 696-702.
- Morello H., 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., 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.
- Nicholas AP., Hancock MB.** (1988). Immunocytochemical evidence for substance P and serotonin input to medullary bulbospinal adrenergic neurons. *Synapse*, 2: 569-576.

- Nicholas AP., Hancock MB. (1989). Evidence for substance P, serotonin and oxytocin input to medullary catecholamine neurons with diencephalic projections. *Brain Res. Bull.*, 22: 213-223.
- Nicholas AP., Hancock MB. (1990). Evidence for projections from the rostral medullary raphe onto medullary catecholamine neurons in the rat. *Neurosci. Lett.*, 108: 22-28.
- Nunez E., Englemann F., Bennassayag C., Joyle MF. (1971). Identification et purification préliminaire de la foeto protéine liant les oestrogènes dans le sérum de rats nouveau-nés. *CR Acad. Sci. (Paris)*, 273: 834-841.
- Ojeda SR, Urbanski HF., Ahmed CE. (1986). The onset of female puberty: Studies in the rat. *Recent Prog. In Hormone Res.*, 43: 385-442.
- Ojeda SR., Ramírez VD. (1972). Plasma levels of LH and FSH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology*, 90: 466-472.
- Ojeda SR., Smith-White S., Advis JP., Andrews WW, Aguado LI. (1990). First preovulatory gonadotropin surge in the rodent. En: **Control of the Onset of Puberty**. MM. Grumbach, PC. Sizonenko, ML. Albes (Edits.). Williams & Williams, EUA, 156-182.
- Ojeda SR., Urbanski HF. (1994). Puberty in the rat. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Edits.). Vol. 1., segunda edición. Raven Press. New York, EU, 363-409.
- Osadchuk LV., Braastad BO., Hovland AL., Bakken M. (2001). Handling during pregnancy in the blue fox (*Alopex lagopus*): the influence on the fetal pituitary-adrenal axis. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 123: 100-110.
- Osadchuk LV., Braastad BO., Hovland AL., Bakken M. (2003). Handling during pregnancy in the blue fox (*Alopex lagopus*): the influence on the fetal gonadal function. *Gen. Comp. Endocrinol.*, 132: 190-197.

- Paxinos G., Watson C.** (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, New York, EUA.
- Peyron JM., Petit C., Rampon M., Jouvet M., Luppi PH.** (1998). Forebrain afferents to the dorsal raphe nucleus demonstrated by retrograde and anterograde tracing methods. *Neuroscience*, 82: 443-468.
- Pickel VM., Joh TH., Reiss DJ.** (1976). Monoamine synthesizing enzymes in central dopaminergic, noradrenergic and serotonergic neurons. Immunocytochemical localization by light and electron microscopy. *J. Histochem. Cytochem.*, 24: 792-806.
- Pickel VM., Joh TH., Reiss DJ.** (1977). A serotonergic innervation of noradrenergic neurons in nucleus *locus coeruleus*. Demonstration by immunocytochemical localization of the transmitter specific enzymes tyrosine and tryptophan hydroxylase. *Brain Res.*, 131:197-214.
- Rajaofetra N., Sandillon F., Geffard M., Privat A.** (1989). Pre- and post-natal ontogeny of serotonergic projections to the rat spinal cord. *J. Neurosci. Res.*, 22: 305-321.
- Ramaley J.** (1979). Development of gonadotropin regulation in the pubertal mammal. *Biol. Reprod.*, 20: 1-31.
- Reissenweber JJ., Domínguez R., Griño E., Sas J., Benedetti W., Appeltauer LC.** (1967). Sex differences of the response of the adrenal gland of the rat mesencephalic lesions. *Acta Endocrinologica, (Kbh)*, 54: 263-274.
- Richards JS.** (1980) Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiol. Rev.*, 60: 51-89.

- Rivier C., Rivest S. (1991). Effect of stress on the activity of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis: peripheral and central mechanism. *Biol. Reprod.*, 45: 523-532.
- Ronnekleiv OK., Adelman JP., Weber E., Herbert E., Kelly MJ. (1987). Immunohistochemical demonstration of pro-GnRH and GnRH in the preoptic-basal hypothalamus of the primate. *Neuroendocrinology*, 45: 518-521.
- Ronnekleiv OK., Naylor BR., Bond CT., Adelman JP. (1989). Combined immunohistochemistry for gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and pro-GnRH, and in situ hybridization for GnRH messenger ribonucleic acid in rat brain. *Mol. Endocrinol.*, 3: 363-371.
- Ruzsas C., Limonta P., Martini L. (1982). Role of serotonergic neurones in the control of gonadotrophin and prolactin secretion in the rat. *J. Endocrinol.*, 94: 83-9.
- Sakai K., Touret M., Salvart D., Leger L., Jouvot M. (1977). Afferent projections to the cat *locus coeruleus* as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Res.*, 199: 21-41.
- Schmidt G., Kannisto P., Owman O., Sjoberg N-O. (1988). Is serotonin involved in the ovulatory process of the rat ovary perfused *in vitro*? *Acta Physiol. Scand.*, 132: 251-256.
- Schultheis TD., Dess WI., Ojeda SR. (1992). Postnatal development of sympathetic and sensory innervation of the rhesus monkey ovary. *Biol. Reprod.*, 47:760-767.
- Seeburg PH., Mason AJ., Stewart TA., Nikolics K. (1987). The mammalian GnRH gene and its pivotal role in reproduction. *Recent Prog. Horm. Res.*, 43: 69-98.

- Shannon NJ., Gunnet JW., Moore KE. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neural activity following electrical stimulation of the raphe nucleus. *J. Neurochem.*, 47: 959-965.
- Sherwood NM., Timiras PS. (1970). A stereotaxic atlas of the developing rat brain, Universidad de California Press, Los Angeles, EUA, 1-283.
- Silverman AJ., Livne I., Witkin JW. (1994). The gonadotropin-releasing hormone (GnRH), neuronal systems: immunocytochemistry and *in situ* hybridization. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, JD. Neill (Edits.). vol. 2, segunda edición, Raven Press, New York, EUA, 1683-1710.
- Steinetz BG. (1978). Secretion and function of ovarian estrogens. En: **Handbook of Physiology**. RO. Greep, E. Astwood (Edits.). American Physiological Society , Washington, EUA, 436-466.
- Stratford TR., Wirtshafter D. (1990). Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat. *Brain Res.*, 511: 173-176.
- Takagi H., Senba E., Shiosaka S., Sakanaka M., Inagaki S., Takatsuki K., Tohyama M. (1981). Ascending and cerebellar non-serotonergic projections from the nucleus raphe magnus of the rat. *Brain Res.*, 206: 161-5.
- Takeuchi Y. (1988). Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. En: **Neuronal Serotonin**. NN. Osborne, M. Hamon (Edits.). John Wiley & Sons Press, New York, EUA, 25-26.
- Talbot P., Schroeder PC. (1982). 5-Hydroxy-tryptamine causes contraction of smooth muscle cells in preovulatory hamster follicles. *J. Exper. Zoology*, 224: 427-436.
- Tanaka E., Baba N., Toshida K., Suzuki K. (1993). Serotonin stimulates steroidogenesis in rat preovulatory in rat preovulatory follicles: involvement of 5-HT₂ receptor. *Life Sci.*, 53: 563-570.

- Terranova PF., Uilenbroek J., Saville L., Horst D., Nakamaru Y.** (1990). Serotonin enhances oestradiol production by hamster preovulatory follicles *in vitro*: effects of experimentally induced atresia. *J. Endocrinol.*, 125: 433-438.
- Tinajero JC., Fabbri A., Dufau ML.** (1993). Serotonergic inhibition of rat leydig cell function by propranolol. *Endocrinology*, 133: 257-264.
- Törk I.** (1985). Raphe nuclei and serotonin containing systems. En: **The Rat Nervous System, Hindbrain and Spinal Cord.** G. Paxinos (Editor). vol. 2. Academic Press; New York, EUA, 43-78.
- Törk I.** (1990). Anatomy of the serotonergic system. *Ann. New York Acad. Sci.*, 600: 9-34.
- Urbanski HF., Ojeda SR.** (1985). The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology*, 117: 644-649.
- Van de Kar L., Lorens SA., Vodraska A., Allers G., Green M., Van Orden DE., Van Orden LS.** (1980). Effect of selective midbrain and diencephalic 5,7-dihydroxytryptamine lesions on serotonin content in individual preopticohypothalamic nuclei and on serum luteinizing hormone level. *Neuroendocrinology*, 31: 309-315.
- Van de Kar LD., Lorens SA.** (1979). Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and medial midbrain raphe nuclei. *Brain Res.*, 162: 45-54.
- Villar JM., Chiochio SR., Tramezan JA.** (1984). Origin and termination of dorsal raphe-median eminence projection. *Brain Res.*, 324: 165-170.
- Vitale ML., Villar MJ., Chiochio SR., Tramezzani JH.** (1987). Dorsal raphe lesion alters the estrous cycle and the preovulatory gonadotropin release. *Neuroendocrinology*, 46: 252-257.

- Welses TH., Jhonson BH.** (1981). Stress-induced alterations in secretion of corticosteroids, progesterone, luteinizing hormone and testosterone in bulls. *Endocrinology*, 109: 85-190.
- Whitaker-Azmitia PM.** (1991). Role of serotonin and other neurotransmitter receptors in brain development: basis for developmental pharmacology. *Pharmacol. Rev.*, 43: 553-61.
- Wiklund L., Léger L., Person M.** (1981). Monoamine cell distribution in the cat brain stem. A fluorescence histochemical study with quantification of indolaminergic and *locus coeruleus* cell group. *J. Comp. Neurol.*, 203: 613-647.
- Wray S., Hoffman G.** (1985). Catecholamine innervation of LH-RH neurons: a developmental study. *Brain Res.*, 399: 327-331.
- Wright DE., Jennes L.** (1993). Lack of expression of serotonin receptor subtype-1a, 1c, and -2 mRNA in gonadotropin-releasing hormone producing neurons of the rat. *Neurosci. Lett.*, 163: 1-4.
- Yen SSC.** (2003). Neuroendocrinología de la reproducción. En: **Endocrinología de la reproducción, fisiología, fisiopatología y manejo clínico.** SSC Yen, RB. Jaffe, RL. Barbieri (Edits.). cap. 2, cuarta edición. Editorial medica, Panamericana, España, 31-85.
- Zeng SL., Li YQ., Rao ZR., Shi JW.** (1991). Projections from serotonin- and substance P-like immunoreactive neurons in the midbrain periaqueductal gray onto the nucleus reticularis gigantocellularis pars alpha in the rat. *Neurosci Lett.*, 131: 205-209.
- Zhou FG., Tao-Cheng J-H., Segu L., Patel T., Wang Y.** (1998). Serotonin transporters are located on axons beyond synaptic junctions: anatomical and functional. *Brain Res.*, 805: 241-254.

PUBLICACIONES



SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

SEP

XLIV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS



Monterrey, Nuevo León 26-30 agosto 2001

FACULTAD DE MEDICINA

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DETECCION DE PROLACTINA EN TEJIDOS Y FLUIDOS OCULARES DE LA RATA. Rivera J.C.*, Dueñas Z.*, Martínez de la Escalera, G. y Clapp, C. Centro de Neurobiología-UNAM 76220, Querétaro, Qro.

El fragmento amino-terminal de 16 kDa de PRL (PRL 16K) inhibe la formación de vasos sanguíneos (angiogénesis) *in vivo* e *in vitro*. Estudios recientes muestran que el tratamiento local con anticuerpos anti-PRL induce angiogénesis en la cornea, por lo que existe la posibilidad de que PRLs anti-angiogénicas, como la PRL 16K, pudieran contribuir a la avascularidad de este órgano. Con el propósito de evaluar la presencia de PRL en tejidos (cornea, iris y retina) y fluidos oculares de la rata, establecimos un ensayo inmunoenzimático (ELISA) sensible y específico. El ELISA detectó PRL en la cornea (1.2 ± 0.3 ng/7g de proteína) pero no en el iris, ni en la retina. En el humor acuoso también se determinó PRL inmunorreactiva y sus niveles (33.7 ± 3.19 ng/ml) fueron dos veces mayores a los medidos en la circulación. Consistentemente, Western blots con anticuerpos anti-PRL policlonales y monoclonales detectaron PRLs de 23 kDa y de 16 kDa en la cornea, pero también en el iris y en la retina. En el humor acuoso las proteínas inmunorreactivas fueron de 23 y 25 kDa. La presencia de PRLs en tejidos y fluidos oculares apoya al ojo como un nuevo órgano blanco de la hormona, probablemente de sus efectos anti-angiogénicos. Proyecto apoyado por los donativos DGAPA-UNAM IN226799, CONACYT 34309N y CONACYT 27950.

EFFECTO DE LA LESIÓN QUÍMICA DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ (NDR) EN EL CRECIMIENTO Y MADURACIÓN DEL FOLÍCULO OVÁRICO Y EN LA SECRECIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES OVÁRICAS EN LA RATA PREPÚBER. Monroy J*, Ayala ME, Chavira R* y Domínguez R. Laboratorio de Pubertad de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES Zaragoza, UNAM. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" México.

La secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas, las gonadotropinas y la ovulación son reguladas por el sistema serotoninérgico. Los estudios anatómicos muestran que la innervación serotoninérgica del hipotálamo se origina en neuronas localizadas en el núcleo dorsal y medial del rafe. Resultados previos del laboratorio han mostrado que la lesión química del DRN en el día 30 edad bloquea la primera ovulación. Por ello, para analizar si la falta de ovulación es el resultado de modificaciones en el crecimiento y maduración del folículo ovárico y como consecuencia de cambios en la secreción de hormonas esteroideas ováricas (17β -estradiol (E^2) y progesterona (P^4)), en el presente trabajo se decidió analizar los efectos de la inyección de ácido ascórbico (OS) o la lesión del NDR inducida por la administración de 10 μ g de 5,6-Dihidroxitriptamina a los 30 días de edad sobre el número de folículos y la concentración de E^2 y P^4 . Todos los animales fueron sacrificados diez días después de realizar la lesión. En la tabla se presentan los resultados obtenidos.

	Folículos		E^2 (pg/ml)	P^4 (ng/ml)	
	Totales	Sanos Atresicos			
Testigo	95.0 \pm 7.4	84.7 \pm 7.4	11.3 \pm 1.8	7.6 \pm 1.1	3.4 \pm 0.9
OS	103.5 \pm 9.8	96.8 \pm 9.9	6.7 \pm 1.7	13.2 \pm 2.2	6.4 \pm 1.5
Lesión	72.5 \pm 7.0*	60.2 \pm 7.4*	12.8 \pm 1.9*	5.4 \pm 0.7*	3.2 \pm 0.6

* $p < 0.05$ vs grupo OS (Prueba "t" de Student).

Los resultados obtenidos permiten sugerir que la innervación serotoninérgica que se origina en el NDR participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el crecimiento y maduración del folículo ovárico y la secreción de los estrógenos. Trabajo apoyado por PUIS y DGAPA IN210500 UNAM.

MODULACIÓN SEROTONÉRGICA DE LA MEMORIA NORMAL Y DEFICIENTE: PAPEL DE LOS SITIOS DE RECAPTURA Y LOS RECEPTORES 5-HT₁₋₇. Meneses A. Depto. de Farmacobiología, CINVESTAV-IPN. México D.F. 14000, AP 22026, México.

Evidencia experimental indica que antidepresivos como la fluoxetina y la tianeptina mejoran la memoria. Aunque ambos fármacos modulan la recaptura de la serotonina (5-hidroxitriptamina, 5-HT), se desconoce si los receptores 5-HT₁₋₇ participan en estos efectos. En consecuencia, en el presente trabajo, se analizaron los efectos de la administración de tianeptina y fluoxetina sobre la consolidación o formación de la memoria y se determinó si los sitios de recaptura de la serotonina y los receptores 5-HT₁₋₇ están involucrados. Se encontró que la administración post-entrenamiento de tianeptina o fluoxetina facilitó, en forma dosis-dependiente, la formación de la memoria en la tarea conductual de aprendizaje asociativo de automoldeamiento. La ketanserina (un antagonista 5-HT_{1D/2A/2C}), ligeramente aumento el efecto de la tianeptina, mientras que WAY 100635 (un antagonista 5-HT_{1A}), SB-224289 (un agonista inverso 5-HT_{1B}), SB-200646 (un antagonista 5-HT_{2B/2C}), ondansetron (un antagonista 5-HT₃), GR 127487 (5-HT₄ antagonista), Ro 04-6790 (5-HT₆ antagonista), DR 4004 (un antagonista 5-HT₇), o la fluoxetina bloquearon el efecto facilitador de la tianeptina. Particularmente se observó que la tianeptina y Ro 04-6790 produjeron un bloqueo total de la memoria. Por otro lado, el antagonista SB-200646 o la depleción 5-HT (via PCA), en parte revirtieron el efecto de la tianeptina. Asimismo, la tianeptina normaliza una memoria deficiente producida por la escopolamina (un antimuscarínico) o dizocilina (un antagonista glutamatérgico no-competitivo), pero solo parcialmente aquella inducida por el agonista/antagonista 5-HT_{1B/1D/2A-2C/7} TFMPP. Por último, en dosis efectivas y subefectivas, la coadministración de tianeptina y fluoxetina no modificó la consolidación del aprendizaje; sin embargo, la coadministración con fenserina (un anticolinesterasa), potenció las dosis subefectivas de tianeptina o fluoxetina. En conjunto, los presentes resultados confirmaron (Meneses, 1999) que la serotonina endógena puede modular, por medio de sus sitios de recaptura y los receptores 5-HT₁₋₇, la formación de la memoria y normalizar una deficiente consolidación de la memoria al interactuar con los sistemas de neurotransmisión colinérgico y glutamatérgico. Meneses A. 5-HT system and cognition. *Neurosci. Biobehav. Rev.* 1999, 23:1111-1125. Apoyado por CONACYT (28398M).

DIFERENCIAS ENTRE ESTADOS NEUTROS Y EMOCIONALES (POSITIVOS Y NEGATIVOS) EN EL EEG UTILIZANDO BANDAS ESTRECHAS. Marosi Holczberger Erzsébet, Bazán O*, Yáñez G*, Bernal J*, Fernández T*, Rodríguez M*, Silva J*, Reyes A*. Laboratorio de Neurociencias. FES Iztacala, UNAM. México

Previos estudios de banda ancha en nuestro laboratorio demostraron diferencias significativas en la frecuencia media durante estados emocionales. Estos hallazgos indican que los cambios durante las emociones ocurren en rangos de frecuencias más estrechas que las bandas tradicionales. Este estudio tiene el objetivo de medir potencia absoluta (PA) y potencia relativa (PR) durante emociones positivas, negativas y situación neutra. Hemos calculado estas medidas paramétricas del EEG en 19 bandas estrechas de 1 Hz cada una (desde 1.5 hasta 20.5 Hz). Los sujetos fueron 40 estudiantes masculinos entre 20 y 25 años de edad. Los datos se analizaron con el MANCOVA (con el IQ como covariable). Las variables independientes fueron el estado emocional, los hemisferios y las derivaciones en los 10 derivaciones superiores, en regiones temporales y en la línea media. PA. Efecto de estado se observó en: la banda 3.6-4.5 Hz en las regiones temporales y en 6.6-7.5 y 14.6-15.5 Hz en las derivaciones superiores. No se observaron diferencias hemisféricas. PR. Efecto de estado se observó en las bandas de 7.6-9.5 Hz en todas las regiones, y de 6.6-7.5 Hz en las zonas temporales. La condición neutra fue mayor que la emocional. Obtuvimos diferencias hemisféricas entre los estados emocionales en las frecuencias: 4.6-5.5, 8.6-9.5 y 17.6-18.5 Hz, en todas las regiones. Estos datos demuestran que los cálculos con banda estrecha son más adecuados para trabajar con emociones ya que ninguno de los resultados cubrió todo el rango de las bandas tradicionales. Los resultados de participación hemisférica están parcialmente de acuerdo con estudios hechos con banda ancha. Además podemos resumir, que la idea de trabajar solamente con áreas frontales en relación a las emociones no es aceptable, ya que la región temporal juega un papel igualmente importante.



ACADEMIA DE INVESTIGACION
EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION A.C.

XXVII REUNION ANUAL

Michoacán

30 de Junio de 1974

EFFECTO DE LA LESIÓN DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ (NDR) PRODUCIDA POR LA INYECCIÓN DE 5,6-DIHIIDROXITRIPTAMINA (5,6-DHT) EN LA SECRECIÓN DE LAS GONADOTROPINAS EN LA RATA PREPÚBER. Juana Monroy¹, Ma. Elena Ayala¹, Roberto Chavira², Roberto Domínguez¹.

¹ Laboratorio de Pubertad de la U.I.B.R., FES Zaragoza, UNAM. AP 9-020. México DF. ² Instituto Nacional de Ciencias Medicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" México DF.

La lesión química del NDR (10µg de 5,6-DHT) en ratas de 30 días edad bloquea la primera ovulación. En el presente trabajo se analiza si la falta de ovulación es el resultado de la modificación en la secreción de las gonadotropinas, de progesterona (P₄) y 17β-estradiol (E₂) y la concentración de serotonina (5-HT) en el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM) en días previos a la primera ovulación. Grupos de animales con inyección de ácido ascórbico testigo o con 5,6-DHT fueron sacrificados a los 2, 4, 6, 8, 10 ó 12 días después del tratamiento. En los animales sacrificados a los seis días después de la lesión del NDR se incrementó la concentración sérica de FSH (4.6±0.6 vs 2.9±0.4, p<0.05). La concentración de LH disminuyó en los animales sacrificados a los cuatro días (0.2±0.03 vs 0.7±0.2, p<0.05). La concentración de P₄ incrementó en los animales sacrificados dos días después de la lesión (15.5 ± 2.2 vs 0.5 ± 0.06, p<0.05). En cambio en los animales sacrificados ocho y doce días después de la lesión, la concentración de P₄ fue menor (Ocho días: 1.5±0.4 vs 9.9±1.1; Doce días: 4.7 ± 0.6 vs 7.1, p<0.05). La concentración de E₂ se incrementó a los cuatro días de realizar la lesión (15.4±2.6 vs 7.5±0.6, p<0.05) y disminuyó diez (5.4±0.7 vs 13.2±2.2, p<0.05) o doce días después de la misma (5.2±0.8 vs. 23.4±3.4, p<0.05). La lesión del NDR provocó disminución en la concentración de 5-HT en el HA y HM a partir de los cuatro días de realizar la lesión. La concentración del 5-HIAA en el HA disminuyó significativamente a partir del segundo día después de la lesión y en el HM la disminución se observó a los cuatro y doce días después de la lesión. Los resultados obtenidos permiten sugerir que la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR es esencial en el mantenimiento de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la función del ovario del animal prepúber. Apoyado por DGAPA IN210500, DGEP y PUIS UNAM y CONACyT.

SOCIEDAD MEXICANA DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS

XLV

CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS



**Universidad de Colima
8-12 de septiembre de 2002**

MODIFICACIONES EN EL CRECIMIENTO DEL FOLÍCULO OVÁRICO DE LA RATA PREPÚBER CON LESIÓN QUÍMICA DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ (NDR). Morroy J^a, Ayala ME, Chavira R^a y Domínguez R. Laboratorio de Pubertad de la UIBR, FES-Zaragoza, UNAM. Instituto Nacional de Ciencias Médicas y de la Nutrición, México.

La innervación serotoninérgica del hipotálamo se origina en neuronas localizadas en los núcleos del rafe. También se acepta que la secreción de las gonadotropinas y las funciones del ovario son reguladas por el sistema serotoninérgico. La inyección de 10 µl de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR de la rata de 30 días edad, bloquea la primera ovulación. Para analizar si la falta de ovulación es el resultado de modificaciones en el crecimiento y la función endócrina del folículo ovárico, se analizaron los efectos de la inyección de ácido ascórbico al 0.05% o la lesión del NDR, producida por la 5,6-DHT sobre la población folicular y las concentraciones sérica de progesterona (P₄) y 17β-estradiol (E₂). Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados ocho, diez o doce días después de realizar la intervención quirúrgica. En los animales sacrificados a los ocho y diez días después de la lesión del NDR, el número total de folículos medidos disminuyó (Ocho: 77.3±9.3 vs. 139.8±8.0; Diez: 72.5±7.0 vs. 103.5±9.8, p<0.05) y se incrementó a los doce días (143.7±10.5 vs. 88.0±11.0, p<0.05). La concentración de P₄ disminuyó en los animales sacrificados a los ocho o doce días después de la lesión (Ocho: 1.5±0.4 vs. 9.9±1.1; Doce: 7.1±0.9 vs. 4.7±0.6, p<0.05). En los animales sacrificados a los diez y doce días la concentración de E₂ en los animales desvernados fue menor que los testigos (Diez: 5.4±0.7 vs. 13.2±2.2; Doce: 15.2±0.8 vs. 25.4±3.4, p<0.05). Con base en los resultados obtenidos sugerimos que la innervación serotoninérgica que se origina en el NDR es esencial en el mantenimiento de los mecanismos neuroendócrinos que regulan las funciones del ovario.

Apoiado por DGAPA IN210500, DGEP, PUIS y CONACyT.

C-231

AFLUENCIA DE LINFOCITOS EN EL ENDOMETRIO DE LA CONEJA, DURANTE LOS PRIMEROS DÍAS DE LA GESTACIÓN TEMPRANA Y PSEUDOGESTACIÓN. Zamora, H.V., Villaseñor G.H.^a, Anzaldúa, A.S.^a, Romano, M. y Pérez-Martínez, M^a. Depto. de Morfología, Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM y Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias del CINVESTAV, IPN., México, D.F.

En el contexto de la interacción inmunoendocrina que ocurre en el inicio de la gestación, la progesterona destaca por su papel regulador de diversos procesos tisulares. Con el propósito de evaluar la actividad migratoria de los linfocitos totales en el endometrio de conejas durante la gestación temprana y pseudogestación inducida con hCG se utilizaron conejas Nueva Zelanda gestantes y pseudogestantes (n= 41). En ambos grupos se evaluó la migración de linfocitos al endometrio en los días 1 al 5 y 8 postcoito. Se obtuvieron fragmentos de ambos cuernos uterinos de cada animal que se procesaron por inclusión en parafina para obtener cortes de 6-8µm y se tiñeron con Giemsa para identificar a los linfocitos. Se contaron los linfocitos presentes en 25 campos microscópicos, en la lámina epitelial-lámina propia de tejido conjuntivo con el objetivo 40X y un ocular con retícula micrométrica. El número de linfocitos totales presentes en el endometrio durante los días 1 al 5 y 8 de la gestación fue menor (P<0.05) con respecto a los valores encontrados en las hembras testigo, no gestantes (NG). En las animales pseudogestantes también hubo un menor número de linfocitos con respecto a las conejas NG, sin embargo la disminución de linfocitos encontrada en los días 1 y 2 fue más evidente que la observada para estos días en las conejas gestantes. En el día 8 se encontró menor número de células que el resto de los demás días. Se concluye que durante los 8 primeros días de la gestación el número de linfocitos presentes en la mucosa uterina disminuye y que en el estado de pseudogestación ocurre un patrón de afluencia de linfocitos similar al observado en la gestación. +Financiado por PAPIIT-UNAM (Proyecto IN 212101).

LOS ESTEROIDES SEXUALES MODULAN LOS EFECTOS DE LA TIMULINA EN LA LIBERACIÓN DE LA FSH Y LH POR LAS CÉLULAS DE ADENOHIPÓFISIS DE RATA HEMBRA. Hinojosa, L.^{1a}, García, L.^{1a}, Chavira, R.^{2a}, Cárdenas, M.^{2a}, Romano, M.C.^{2a}, Domínguez, R.¹ y Rosas, P.^{1a}. ¹UIBR, FES-Zaragoza, UNAM. ²INCMN "Salvador Zubirán". ³Depto. de Fisiología, Biofísica y Neurociencias, CINVESTAV, IPN, México, D.F., México.

Previamente mostramos que los efectos de la timulina (T) en las células de adenohipófisis (CAHF) de rata modifican la liberación *in vitro* de las hormonas estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH) dependiendo del día del ciclo estral. Por ello en el presente estudio se analizó la participación de los esteroides sexuales en la respuesta de las CAHF a la T, en la liberación de las gonadotropinas. Se utilizaron CAHF de rata hembra, pre-incubadas por 24 h en medio de cultivo con suero lavado. Posteriormente, las células se trataron durante 24 h con progesterona (P₄) [50 ng/ml] o testosterona (TS) [100 pg/ml] o 17β-estradiol (E₂) [100 pg/ml]. Al término de este tiempo, se cambió el medio y se agregó la T (100 ng), en presencia o no de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) [10⁻⁹ M]. Los cultivos se incubaron por tres horas. En el medio se evaluó la concentración de FSH y LH (ng/ml) por RIA. Los resultados se expresan en media ± e. m.

Grupo	Testigo	T	GnRH	GnRH+T
FSH	11.4±1.4	11.8±1.4	21.4±3.8 a	30.8±6.5
P ₄	13.0±2.0	22.3±2.4 a	17.9±1.7	20.6±1.7
TS	15.5±3.4	9.4±0.7	13.2±1.4	30.1±6.0 b
E ₂	8.5±0.5	13.9±3.1	29.6±5.4 a	18.2±1.0
LH	58.6±6.1	53.3±3.9	178.7±20.0 a	169.1±18.8
P ₄	47.7±5.0	77.1±10.0 a	98.1±10.4 a	113.2±7.6
TS	59.2±4.0	49.4±3.8	109.3±12.4 a	144.7±6.2 b
E ₂	51.2±3.3	69.8±5.0 a	149.6±21.1 a	135.7±11.8

a, p<0.05 vs. Testigo; b, p<0.05 vs. GnRH

Los resultados muestran que la P₄ y el E₂ modulan los efectos de la T sobre las CAHF no estimuladas, ocasionando una mayor liberación de las gonadotropinas y la TS sólo lo hace al adicionarles GnRH, lo que sugiere que la acción de la timulina sobre los gonadotropinos depende de la sensibilidad que les confiere el esteroide y de la presencia de GnRH. Apoyado por DGAPA-PAPIIT IN217301, PAEP 101312, 101313 y CONACyT.

C-232

EFECTOS DEL TRATAMIENTO CRÓNICO CON PLOMO SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA EN LA RATA ADULTA. Ruiz, M.^a (avalado por Morán José Luis), Handal, A.^a, Morán, C.^a & Gómez, E.^a Laboratorio de Investigaciones Biológicas, Instituto de Ciencias, BUAP.

Se ha descrito que el plomo induce alteraciones significativas en la ontogenia y el funcionamiento del sistema reproductor. Con el fin de analizar los efectos de la ingestión crónica de diferentes concentraciones de acetato de plomo sobre el inicio de la pubertad, el desarrollo folicular y la ovulación, en el presente trabajo se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa C57-ZV que fueron expuestas a diferentes concentraciones de acetato de plomo en el agua de beber durante 90 días, a partir del destete (30 días de edad). Cuatro grupos experimentales recibieron 0.0 (Control), 0.003, 0.03 y 0.6 g/l de acetato de plomo disuelto en el agua de beber, respectivamente. Los animales se sacrificaron en la mañana del primer estro vaginal después de los 120 días de edad. A la autopsia se diseccionaron y pesaron los ovarios y el útero, que fueron analizados histológicamente. La concentración de plomo en la sangre fue similar entre los grupos experimentales tratados con 0.003 y 0.03 g/l de acetato de plomo (5.8±1.6 vs. 3.4±0.7 µg/dL, n.s.), pero en el grupo tratado con 0.6 g/l, los niveles de plomo fueron significativamente más altos (18.2±2.2 µg/dL vs. las otras concentraciones de acetato de plomo, p<0.001; ANDEVA / Tukey-Kramer). En el grupo tratado con 0.6 g/l de acetato de plomo se observó un adelanto de la pubertad respecto a los grupos tratados con bajas concentraciones (0.003 y 0.03 g/l: 55.1±0.9 vs. 0.6 g/l: 49.8±1.6 días, p<0.001; U de Mann-Whitney). El peso de los ovarios y del útero fue similar en todos los grupos. El número de cuerpos lúteos frescos encontrados en los ovarios de los animales tratados con plomo fue significativamente menor, independiente de la concentración a la que fueron expuestos (Control: 10.8±0.8 vs. Acetato de Plomo: 6.2±0.5, p<0.001; U de Mann-Whitney). El porcentaje de atresia en la población folicular en los animales tratados con 0.6 g/l de acetato de plomo se incrementó en un 36% comparado con el control. El porcentaje de folículos preantrales sanos disminuyó a medida que se incrementó la concentración de plomo en el agua de beber (Control: 91.7±6.2 vs. 0.003 g/l: 80.8±0.9, 0.03 g/l: 68.7±5.9 y 0.6 g/l: 53.4±13.7). Estos resultados nos permiten sugerir que la intoxicación crónica con plomo inhibe la ovulación al afectar los mecanismos que controlan el desarrollo folicular de los ovarios. La ingestión de plomo a partir del momento del destete induce alteraciones significativas en los mecanismos endocrinos y neuroendocrinos que regulan la pubertad de la rata (Apoyado por FOMES 2000-22-22).

Below is sessioning information for your abstract presentation at the SFN Annual Meeting, November 2-7 in Orlando, FL. Please contact us at program@sfn.org if you have any questions. We appreciate your participation in this year's meeting.

Date: Monday, Nov. 4, 2002

Poster Session: 1:00 p.m.

Session Number: 369.2

Session Title: Neuroendocrine: puberty, pregnancy, parturition

Abstract Title: THE OVULATION BLOCKADE PRODUCED BY THE INJECTION OF THE 5,6-DIHYDROXYTRYPTAMINE (5,6-DHT) INTO DORSAL RAPHE NUCLEUS (DRN) IS REESTABLISHED BY SYSTEMIC NORADRENERGIC BLOCKADE IN PUBERTAL RAT.

Presentation time: 2:00 p.m.

Location: Orange County Convention Center: Posterboard # J-20

THE OVULATION BLOCKADE PRODUCED BY THE INJECTION OF THE 5,6-DIHYDROXYTRYPTAMINE (5,6-DHT) INTO DORSAL RAPHE NUCLEUS (DRN) IS RESTABLISHED BY SYSTEMIC NORADRENERGIC BLOCKADE IN PUBERTAL RAT.

J. Monroy¹; ME. Ayala¹; R. Chavira²; R. Domínguez¹

1. UIBR FES Zaragoza, UNAM, México City DF 15000, México.

2. Instituto Nacional de Ciencias Medicas y de la Nutrición "Salvador Zubirán" México City DF México

The lesions of the DRN produced by 5,6-DHT local injection blocked the ovulation in the pubertal rat. To analyze if such result depends on an overstimulation of the noradrenergic system, the effects of propranolol (Prop) injection to prepubertal rats with a lesion in the DRN on puberty (age of vaginal opening (VO), age of first vaginal estrous (VE)), ovulation rate, number ova shed, progesterone [P^4] and 17β -estradiol [E^2] serum concentration were studied. Significant differences in the age of VO, VE and [E^2] were not observed. Prop injection and reestablish ovulation rate (11/15 vs. 0/11, $p < 0.01$, Fisher's exact probability test) and number ova shed (9.8 ± 0.5 vs. 0.0 , $p < 0.01$, Mann-Whitney U test) and [P^4] (7.5 ± 1.8 ng/ml vs. 2.1 ± 0.4 , $p < 0.05$, Student's t test). Present results suggest that the blockade of ovulation results by the DRN lesion include the overstimulation of noradrenergic system.

Supported by: DGAPA IN210500, DGEP and PUIS UNAM and CONACyT.

Comparative effects of injecting 5,6-dihydroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty

Juana Monroy^a, María Elena Ayala^{a,*}, Roberto Chavira^b,
Pablo Damián-Matsumura^c, Roberto Domínguez^a

^a *Laboratory of Puberty, Biology of Reproduction Research Unit, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, AP 9-020, CP 15000, México, DF, Mexico*

^b *Departamento de Biología de la Reproducción, INCMN Salvador Zubirán, México, DF, Mexico*

^c *Departamento de Biología de la Reproducción, UAM, Iztapalapa, México, DF, Mexico*

Received 21 January 2003; accepted 27 January 2003

Abstract

The role played by the serotonergic system in the control of puberty onset and first ovulation in rats is studied in this paper by analyzing the effects of injecting the neurotoxin 5,6-dihydroxytryptamine (5,6-DHT) into the dorsal (DRN) or medial (MRN) raphe nucleus of 30-day-old female rats. Complete lesion to the DRN resulted in the blockade of ovulation and a decrease in both the number of ovarian follicles and the serum concentration of follicle stimulating hormone (FSH). This treatment was also found to be associated with an increase in serotonergic activity in the anterior and medial hypothalami. A lesion to the central portion of the DRN resulted in a significant decrease in the concentration of progesterone in serum and in the number of ova shed by ovulating animals. The lesion to the lateral portion of the DRN did not have an apparent effect on ovulation rate, the number of ova shed, nor in hormone serum concentration.

The injection of propranolol to rats with a lesion to the DRN restored ovulation in 73% of treated animals and returned serotonergic activity in the anterior hypothalamus to levels similar to those of sham-operated animals. In turn, in the medial hypothalamus, the increase in serotonergic activity was not modified. The results presented herein suggest that serotonergic inputs to the anterior hypothalamus have a direct influence on gonadotropin secretion and first ovulation, while the noradrenergic innervation exerts an indirect influence.

© 2003 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Raphe nucleus; Ovulation; Puberty; Hypothalamus; Serotonin

1. Introduction

Serotonergic innervations of the hypothalamus median eminence arise from the dorsal raphe nucleus (DRN) [30,32], while in turn, the medial raphe nucleus (MRN) sends information to the pre-optic area (POA) and the median eminence [4,30].

Serotonin (5-HT) stimulates the secretion of luteinizing hormone (LH) through a direct effect on gonadotropin releasing hormone (GnRH) neurons, influencing the rate of GnRH release [12]. However, results from studies on pharmacological manipulations of the serotonergic system are interpreted in a contradictory way, resulting in controver-

sial assumptions about the physiological role of 5-HT in the regulation of gonadotropin secretion [14,15,21].

In female adult rats, electrical stimulation to the MRN results in a reduction of LH levels and the blockade of ovulation, while a similar stimulation to the DRN caused no apparent changes in the LH surge pattern nor in the number of ovulating rats. Electrolytic lesions to the MRN have no apparent effects on pre-ovulatory LH release, while a lesion to the DRN results in a blockade of ovulation and in a reduction of LH serum levels [19]. Such results suggest that hypothalamic serotonergic inputs originating from the DRN or MRN play distinct roles in regulating ovulation and gonadotropins secretion. During proestrus, the DRN stimulates the surge of LH, while the MRN seems to play an inhibitory role on the pre-ovulatory release of LH [18,19].

The chemical lesion to the serotonergic DRN or MRN system of 21 days old animals, achieved by injecting the neurotoxin 5,7-dihydroxytryptamine (5,7-DHT), and the

* Corresponding author. Tel.: +52-55-56-23-07-11;

fax: +52-55-57-73-63-32.

E-mail address: marayalamx@yahoo.com.mx (M.E. Ayala).

subsequent injection of pregnant mare serum gonadotropin (PMSG) when 30 days old, resulted in the blockade of the induced ovulation. This treatment also results in a reduction of [^3H]5-HT uptake in the arcuate nuclei and median eminence [17]. These results have been interpreted as an indication that the serotonergic projections arising from the DRN and MRN terminating in the hypothalamus, play a facilitating role on the mechanisms regulating ovulation.

Thermal lesion to the DRN of 30-day-old rats blocked ovulation on the first day of vaginal estrus, and increased atresia in pre-ovulatory follicles, suggesting that the DRN plays a stimulatory role in regulating the gonadotropin secretion mechanisms that trigger ovulation [3]. Since the DRN contains serotonergic and non-serotonergic neurons [27,29], the effects of thermal or electrolytic lesions to the DRN cannot be solely attributed to the effects on the serotonergic system. Therefore, the role played by the hypothalamic serotonergic innervation (arising from the DRN or MRN), regulating the hypothalamic–pituitary–ovary axis during puberty on rats, is not clear.

Supported by the evidence that 5,7-DHT destroys serotonergic and noradrenergic neurons [7], this study was designed to analyze the effects caused by destroying the serotonergic neurons of the DRN or MRN on puberty onset and first ovulation on rats. Serotonergic neuronal destruction of the DRN or MRN was achieved by a localized injection of the specific serotonergic neurotoxin 5,6-dihydroxytryptamine (5,6-DHT). Because the effects of thermal lesions to the DRN have been explained by the serotonergic afferent into the locus coeruleus (LC) arising from the DRN, which tonically inhibit the activity of the noradrenergic neurons localized in the LC [20], this study also analyzed the effects of propranolol, a β -adrenergic blocker, on spontaneous ovulation in rats with a lesion in the DRN.

2. Materials and methods

Thirty-day-old female rats of the CIIZ-V strain from our own breeding stock were maintained under controlled light conditions (lights on from 05:00 to 19:00 h), with free access to food and tap water. Animals were allocated at random to one of the following groups:

2.1. Control group

Animals were left untouched and killed on the day of first vaginal estrus.

2.2. Lesioned group

Animals were anaesthetized with sodium pentobarbital (Anestesal, Smith Kline Norden of Mexico, Mexico) and placed in a stereotaxic apparatus. The skin head was opened, the skull drilled and a number 29-needle (13-mm long) introduced, following parameters of the stereotaxic atlas by

Sherwood and Timiras [25]. Coordinates for the DRN are: AP = 0.7 mm from lambda, H = 3.3 mm, and L = 6.4 mm at a 30° angle from the dorsal raphe in relation to its perpendicular axis. For the MRN: AP = 0.5 mm, H = 4.9 mm, and L = 8.0 mm at a 35° angle in relation to its perpendicular axis. To produce the lesion on the DRN or the MRN, the needle was connected, via tubing, to a 100 μl Hamilton syringe mounted on a microinjection pump (MCA/100 Bionalytical Systems, Inc., West Lafayette, IN, USA). Ten micrograms of 5,6-DHT (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA), dissolved in 2.5 μl of 0.05% ascorbic acid (pH 3.5), was injected at infusion rates of 1 $\mu\text{l}/\text{min}$.

2.3. Sham-operated group

Animals were anaesthetized and placed in a stereotaxic apparatus. The skin was opened, the skull drilled and the needle introduced, following the same parameters used in the lesion group. An amount of 2.5 μl of 0.05% ascorbic acid was injected.

2.4. Propranolol-injected group

Rats bearing lesions to the DRN and sham-operated animals were injected with propranolol (Sigma) intraperitoneally (6 mg/kg) when 38 days of age.

The onset of puberty (vaginal opening) was recorded and vaginal smears were taken thereafter. All animals were killed by decapitation between 08.00 and 11.00 h, during the first day of vaginal estrus.

2.5. Autopsy procedure

During autopsy the brain was quickly removed and placed in a cold saline solution. After careful removal of the optic chiasma, two slices of the hypothalamus were obtained. With a fine forceps, the anterior hypothalamus was removed (Bregma -0.8 to Bregma -1.8). This operation included the removal of the lateral and median pre-optic nuclei, the suprachiasmatic, the paraventricular, the periventricular, and the estria terminal pre-optic. The medial hypothalamus (Bregma -2.3 to Bregma -3.3) including median eminence and arcuate nucleus were also removed [22]. Both the hypothalamic regions were stored at -70 °C until 5-HT and its metabolite levels were measured using high performance liquid chromatography (HPLC).

The blood from the trunk of the animals was collected, allowed to clot, and centrifuged at 3000 rpm. The serum was stored at -20 °C, until progesterone, 17 β -estradiol, LH, and follicle stimulating hormone (FSH) levels were measured. Oviducts were dissected, the tubal ova removed, and the number of ova counted under a dissection microscope. The ovaries and uterus were dissected and weighed in a precision balance. The ovaries were fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin wax, serially sectioned at 10- μm thickness, and stained with hematoxylin–eosin.

The follicular population was studied following previously described methodologies [2].

2.6. Hormone determination

Serum concentration of progesterone (ng/ml) and 17 β -estradiol (pg/ml) were measured by specific radioimmunoassay (RIA), using kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). The intra- and interassay coefficients of variation were 5.3 and 9.87% for progesterone and 6.9 and 10.8% for 17 β -estradiol. The detection limits for progesterone and 17 β -estradiol were 0.09 and 0.005 ng/ml, respectively. Serum LH and FSH levels were measured by RIA, using the double antibody technique, with reagents and protocol supplied by the National Hormone and Pituitary Programs (Baltimore, MD, USA). Values were expressed in ng/ml in terms of the reference preparation NIH LH-RP2 and FSH-RP2. The intra- and interassay coefficients of variation were 7.91 and 5.74% for LH and 9.3 and 6.82% for FSH. The detection limit for LH and FSH was 0.05 and 0.01 ng/ml, respectively.

2.7. Measurement of 5-HT and its major metabolite 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA)

The amount of 5-HT and 5-HIAA was measured following the methodology described by Ayala et al. [2]. Tissue samples were weighed and homogenized in 300 μ l of 0.1N perchloric acid, and subsequently centrifuged at 12,500 rpm for 30 min at -4°C . The supernatant was filtered using 0.2 μ m regenerated cellulose filters. Twenty microliters of this extract was injected into the HPLC system for analysis. The HPLC apparatus consisted of an isocratic pump (Perkin Elmer Co., Norwalk, CT, USA, model LC-250), a Rheodyne injection valve (20 μ l), and a C18 column (4.6 mm i.d. \times 25 cm; 10 μ m spheres, Bionalytical Systems, Inc., USA), protected by a pre-column cartridge filter (10 μ m, 4.6 mm i.d. \times 3 cm, Bionalytical Systems, Inc.). The concentration of 5-HT and 5-HIAA were quantified electrochemically, using a BAS LC-4C amperometric detector and an LC-4A glassy carbon transducer cell (Bionalytical Systems, Inc.). The mobile phase consisted of 0.1 M citrate buffer (pH 3.0), with 100 mg of 1-octane-sulfonic acid (Sigma) previously filtered and degassed with helium under vacuum conditions. Twenty milliliters of acetonitrile and 15 ml of tetrahydrofuran (Omnisolve and Science, Canada) were immediately added. A total volume of 500 ml was used for chromatography analysis. The phase was pumped at a flow rate of 1.2 ml/min. Stock standard solutions were prepared and diluted on the day of the experiment using 0.1 M perchloric acid. Stock standard (Sigma) solutions were diluted on the day of the experiment in 0.1N perchloric acid. The system was calibrated from a standard curve obtained by injecting stock ranging in concentration from 0.1 to 1 ng/ μ l. 5-HT and 5-HIAA were identified by the relative retention times compared to standards. Using a 1020 Perkin Elmer

Nelson integrator, 5-HT and 5-HIAA concentrations were determined by comparing high peak ratios of unknown samples with their respective standards. Results are expressed as nanograms of neurotransmitter per milligram of wt. tissue (ng/mg). Neuronal activity was calculated following the ratio described by Kerdelhue et al. [13] and Shannon et al. [24], where neuronal activity = [5-HIAA]/[5-HT].

2.8. Brain histology

After dissecting the hypothalamus, the caudal portion of the brain was fixed in 10% formalin, for at least 48 h. Using a cryostat, samples were frozen and sectioned at 100 μ m, and later stained with cresyl violet to confirm the location and extension of the lesion. Based on the histological examination of the lesions, animals subjected to injection of 5,6-DHT on the DRN or MRN, were assigned to one of three groups:

- (A) Animals with complete lesion to the DRN or MRN (Fig. 1).
- (B) Animals with a partial lesion to DRN or MRN. This group included animals with a:
 - (i) lesion to the central region of the DRN (Fig. 2);
 - (ii) lateral lesion to the DRN (Fig. 3), when the injured area included the right side of the nuclei with little or no destruction of the substantia grisea periventricularis;
 - (iii) partial lesion to the MRN (Fig. 3). This group showed a lesion to the ventral portion of the nuclei only.
- (C) Animals with a lesion outside the MRN (Fig. 2).

2.9. Statistical analysis

The age of vaginal opening and first vaginal estrus, as well as the number of ova shed, were analyzed by a Kruskal–Wallis test followed by the Mann–Whitney *U*-test. Ovulation rates (number of ovulating rats/number of treated animals) were compared by Chi-square test. The weight of the ovaries and uterus, as well as the concentration of progesterone, 17 β -estradiol, FSH, LH, and [5-HIAA]/[5-HT], were analyzed by analysis of variance (ANOVA), followed by Tukey's test. When the results of two groups were compared, a Student's *t*-test was performed. All values are expressed as the mean \pm S.E.M. A probability of less than 5% was considered significant.

3. Results

3.1. Effects on puberty, ovulation, and serum hormones levels produced by sham operation of the DRN or MRN

Compared to control animals, DRN sham-operated rats showed a delay in the age of vaginal opening and first

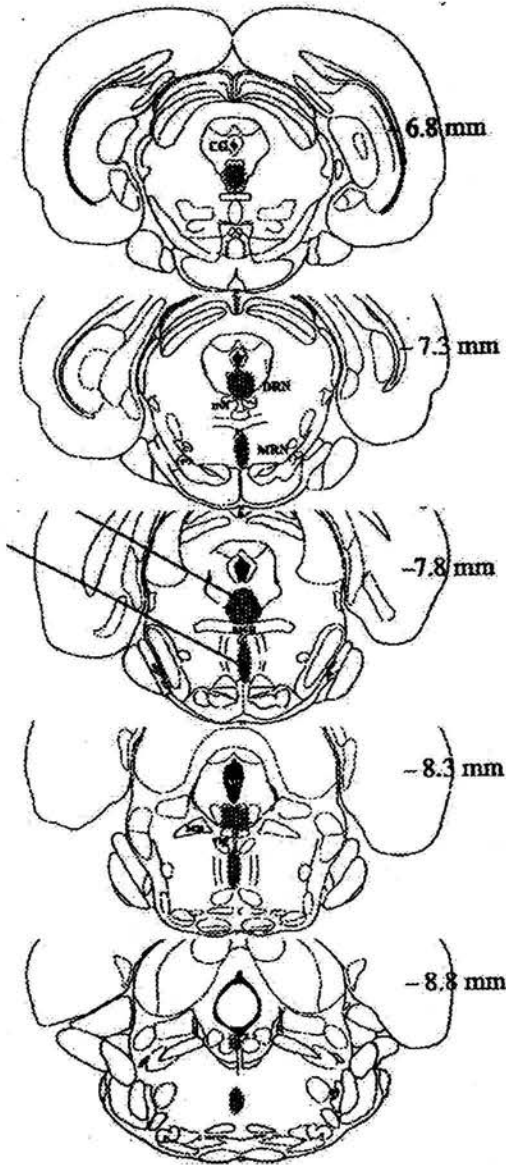


Fig. 1. Diagrammatic representation of complete lesion of the dorsal (DRN) or medial raphe nuclei (MRN) on coronal sections. Locations of the lesions are indicated by blackened area. Aq, cerebral aqueduct; CG, central gray; xscp, decussation superior cerebellar peduncle; mlf, medial longitudinal fasciculus; scp, superior cerebellar peduncle; vtg, ventral tegmental nucleus.

vaginal estrus (vaginal opening 43.4 ± 0.8 versus 41.1 ± 0.5 ; first vaginal estrus 44.3 ± 0.7 versus 42.0 ± 0.5 , $P < 0.05$, Student's *t*-test). Such differences were not observed in MRN sham-operated animals. Sham operations to the DRN or MRN did not modify the ovulation rate nor the number of ova shed by ovulating animals. Sham operation to the DRN did not modify hormone serum levels, while the sham operation to the MRN resulted in a significant decrease in progesterone and 17β -estradiol serum levels (3.9 ± 0.3 versus 62.2 ± 1.1 ; 10.8 ± 1.5 versus 23.6 ± 3.5 , $P < 0.05$, Student's

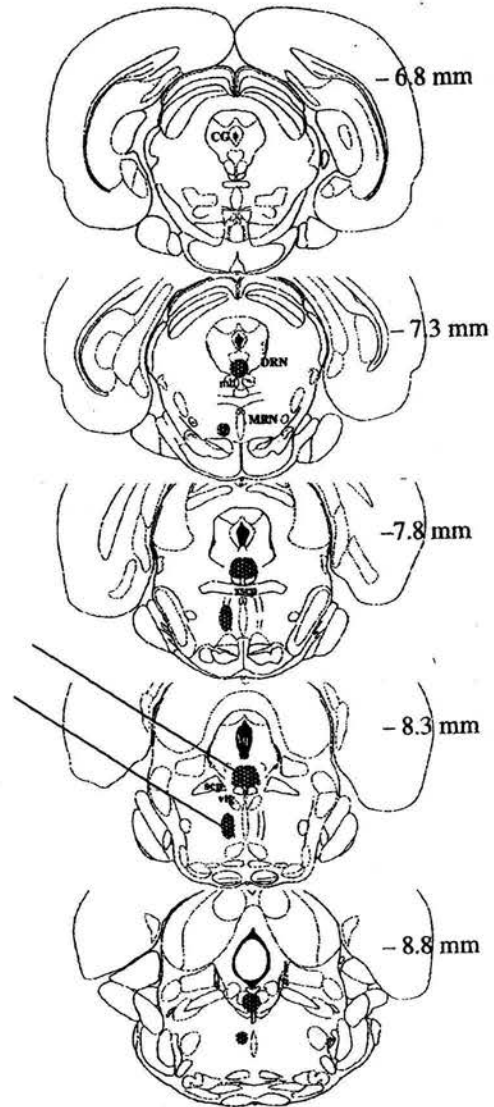


Fig. 2. Diagrammatic representation of central lesion of the dorsal raphe nuclei (DRN) or lesion outside the medial raphe nuclei (MRN) on coronal sections. Locations of the lesions are indicated by blackened area. Aq, cerebral aqueduct; CG, central gray; xscp, decussation superior cerebellar peduncle; mlf, medial longitudinal fasciculus; scp, superior cerebellar peduncle; vtg, ventral tegmental nucleus.

t-test), without modifying the concentration of FSH and LH in serum (Table 1).

Because the sham operation affected some of the parameters studied, the effects of injecting 5,6-DHT on the DRN or MRN were compared with the corresponding sham-operated group.

3.2. Effects of the lesion to the DRN or MRN on puberty onset, ovulation, and serum hormones levels

Vaginal opening and first vaginal estrus age were similar in animals with a complete lesion to the DRN and the

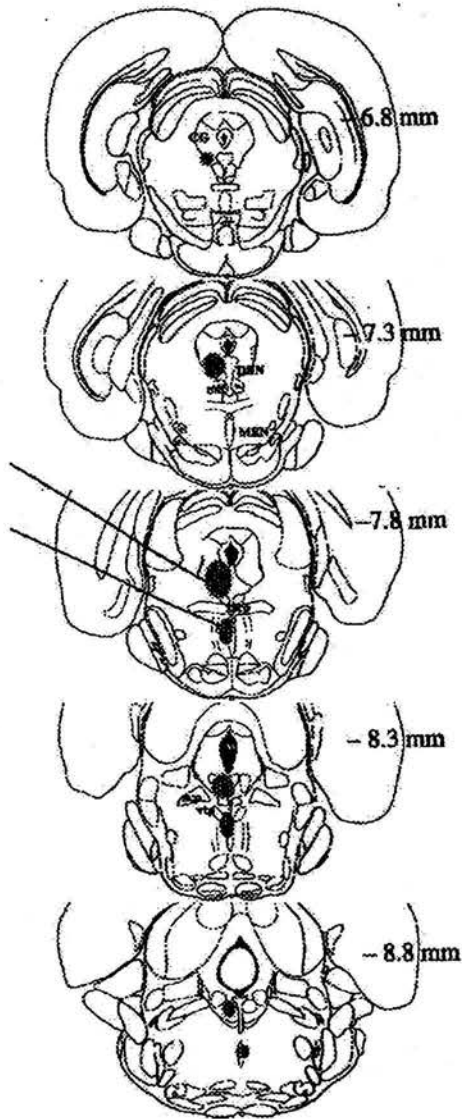


Fig. 3. Diagrammatic representation of lateral lesion of the dorsal (DRN) or partial lesion of medial raphe nuclei (MRN) on coronal sections. Locations of the lesions are indicated by blackened area. Aq, cerebral aqueduct; CG, central gray; xscp, decussation superior cerebellar peduncle; mlf, medial longitudinal fasciculus; scp, superior cerebellar peduncle; vtg, ventral tegmental nucleus.

corresponding sham-operated group. None of the animals with a complete lesion to the DRN ovulated on the day of first vaginal estrus. Progesterone and FSH serum levels showed a significant decrease, while non-significant differences in 17β -estradiol or LH serum levels were observed.

The lesion to the lateral zone of the DRN did not affect any of the parameters studied. The lesion of the central zone of the DRN resulted in a decrease in the number of ova shed and on progesterone concentration, without causing significant changes in 17β -estradiol, FSH or LH serum levels (Table 1). In animals with a complete lesion to the DRN, the number of follicles counted in the ovaries was significantly lower than

in sham-operated animals (52.8 ± 14.0 versus 99.5 ± 14.2 , $P < 0.05$). All pre-ovulatory follicles were atretic.

The complete lesion of the MRN did not affect ovulation rate or the number of ova shed by ovulating animals. A significant increase in progesterone serum concentration was observed, while the serum concentration of 17β -estradiol, FSH, and LH was similar to sham-operated animals. The partial lesion to the MRN, as well as the lesions outside the MRN zone, resulted in a significant increase in 17β -estradiol serum levels, without modifying the other parameters analyzed.

The injection of 5,6-DHT into the DRN or MRN did not have an apparent effect on the weight of the ovaries and uterus (data not shown).

3.3. Effects on serotonergic activity in the anterior and medial hypothalami by sham operation or lesion of the DRN or MRN

Sham operation to the DRN did not modify the [5-HIAA]/[5-HT] ratio in the anterior or medial hypothalamus. When compared to sham-operated animals, the complete lesion to the DRN resulted in a significant increase of the [5-HIAA]/[5-HT] ratio in the anterior and medial hypothalami (Fig. 4). Similar results were observed in the anterior hypothalamus of animals with central (0.6 ± 0.06 versus 0.5 ± 0.08) and lateral lesions to the DRN (anterior hypothalamus: 0.9 ± 0.1 versus 0.5 ± 0.08 ; medial hypothalamus: 0.8 ± 0.1 versus 0.3 ± 0.06 , $P < 0.05$).

No significant differences were observed in the [5-HIAA]/[5-HT] ratio in the anterior hypothalamus of animals with a lesion to the MRN or in MRN sham-operated animals (data not shown).

3.4. Effects of the injection of propranolol to rats with a lesion to the DRN on puberty, ovulation, and serum hormones levels

The blockade of β -adrenergic receptors, induced by the injection of propranolol to rats with a DRN lesion, spontaneously reversed the lesion's blocking action on first ovulation. Progesterone concentration was significantly higher in the propranolol-injected group than in the non-injected group (Table 2). The increase in serotonergic activity in the anterior hypothalamus resulting from the lesion to the DRN was significantly diminished by the propranolol injection. In turn, the increase in serotonergic activity observed in the median hypothalamus was not affected by the blockade of β -adrenergic receptors (Fig. 4).

4. Discussion

The results obtained in the present study suggest that in the pre-pubertal animal, the serotonergic innervation arising from the DRN plays a stimulating role in the neuroendocrine

Table 1

Ovulation rate, mean \pm S.E.M. of number of ova shed and serum concentrations of progesterone (P_4) (ng/ml), 17β -estradiol (E_2) (pg/ml), FSH and LH (ng/ml) of rats with sham operation (Sham) or complete chemical lesion of the dorsal (DRN) or medial raphe nucleus (MRN) or partial lesion of the DRN (lateral or central) or MRN

Group	Ovulation rate	Number of ova shed	P_4	E_2	FSH	LH
Control	37/47	8.9 \pm 0.6	6.2 \pm 1.1	23.6 \pm 3.5	16.1 \pm 1.9	1.4 \pm 0.4
Dorsal raphe nucleus						
Sham	16/18	8.9 \pm 0.7	7.1 \pm 0.9	30.5 \pm 5.0	19.2 \pm 1.4	1.4 \pm 0.1
DRN lateral	13/13	10.4 \pm 0.4	6.5 \pm 1.4	26.8 \pm 4.0	23.2 \pm 1.3	1.6 \pm 0.1
DRN central	15/15	6.4 \pm 0.8 ^a	4.2 \pm 0.6 ^b	30.1 \pm 3.0	24.6 \pm 2.7	1.1 \pm 0.1
DRN complete	0/11 ^c	0	2.1 \pm 0.4 ^b	37.4 \pm 4.3	3.8 \pm 0.6 ^b	2.4 \pm 0.6
Medial raphe nucleus						
Sham	10/14	9.3 \pm 0.7	3.9 \pm 0.3 ^d	10.8 \pm 1.5 ^d	22.3 \pm 2.7	1.4 \pm 1.2
MRN outside	29/32	8.5 \pm 0.7	4.0 \pm 0.4	25.3 \pm 2.8 ^b	17.6 \pm 1.0	1.7 \pm 0.1
MRN partial	7/10	8.3 \pm 0.6	5.8 \pm 0.8	16.3 \pm 2.2 ^c	19.8 \pm 1.9	1.5 \pm 0.2
MRN complete	10/11	9.0 \pm 0.8	11.7 \pm 3.2 ^{b,c}	8.7 \pm 2.1 ^c	21.6 \pm 2.2	1.5 \pm 0.5

^a $P < 0.05$ compared with respective Sham group (Kruskal–Wallis followed by Mann–Whitney test).

^b $P < 0.05$ compared with respective Sham group (ANOVA followed by Tukey's test).

^c $P < 0.05$ compared with respective Sham group (Chi-square test).

^d $P < 0.05$ compared with Control group (ANOVA followed by Tukey's test).

^e $P < 0.05$ compared with MRN outside group (ANOVA followed by Tukey's test).

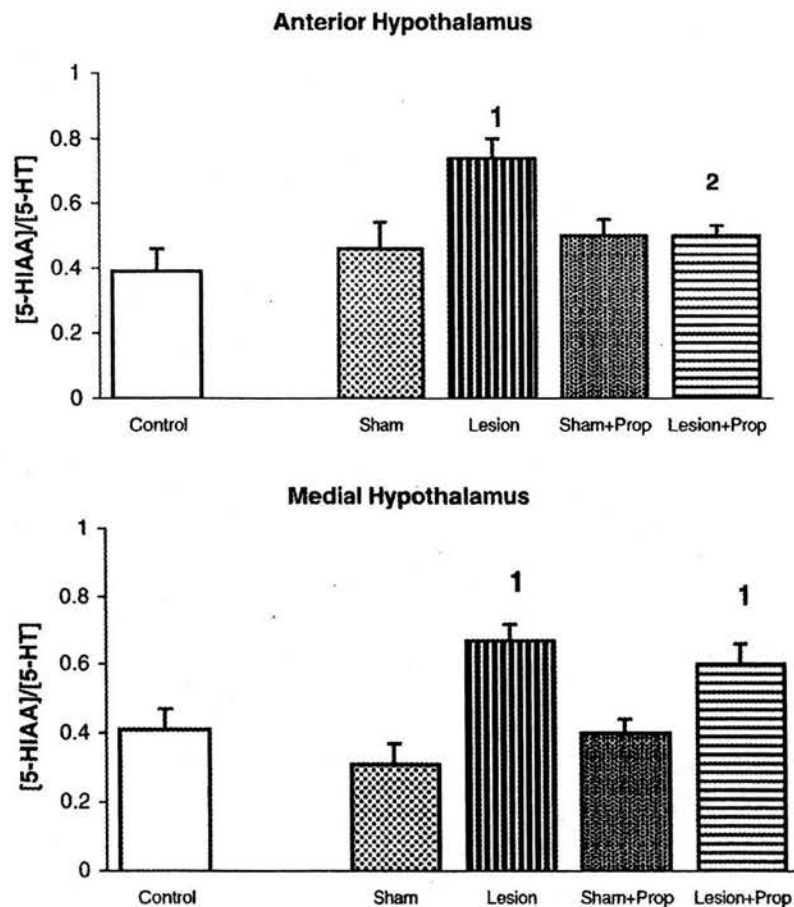


Fig. 4. [5-HIAA]/[5-HT] ratio (mean \pm S.E.M.) in the anterior hypothalamus of control rats, with sham operation (Sham) or complete chemical lesion of the dorsal raphe nucleus (DRN) and injected with propranolol (Prop). ¹ $P < 0.05$ compared with Sham group (ANOVA followed by Tukey's test). ² $P < 0.05$ compared with Lesion group (ANOVA followed by Tukey's test).

Table 2

Ovulation rate, mean \pm S.E.M. of age of vaginal opening (VO) and first vaginal estrus (EV), number of ova shed, and serum concentrations of progesterone (P₄) (ng/ml) and 17 β -estradiol (E₂) (pg/ml) of rats with sham operation (Sham) or complete chemical lesion of the dorsal (DRN) and injected with propranolol (Prop)

Group	VO	EV	Ovulation rate	Number of ova shed	P ₄	E ₂
Sham	43.4 \pm 0.8	44.3 \pm 0.7	16/18	8.9 \pm 0.6	7.1 \pm 0.9	30.5 \pm 5.0
Sham + Prop	41.0 \pm 0.5	42.7 \pm 0.9	8/10	8.9 \pm 1.1	8.3 \pm 1.1	25.6 \pm 7.6
Lesion	44.1 \pm 1.1	46.0 \pm 1.5	0/11	0.0 ^a	2.1 \pm 0.4 ^a	37.4 \pm 4.3
Lesion + Prop	42.5 \pm 0.5	43.6 \pm 0.5	11/15 ^b	9.8 \pm 0.5 ^c	7.5 \pm 1.8 ^d	29.7 \pm 7.4

^a $P < 0.05$ compared with respective Sham and Sham + Prop group (ANOVA followed by Tukey's test).

^b $P < 0.05$ compared with respective Lesion group (Chi-square test).

^c $P < 0.05$ compared with respective Lesion group (Kruskal-Wallis followed by Mann-Whitney *U*-test).

^d $P < 0.05$ compared with respective Lesion group (ANOVA followed by Tukey's test).

mechanisms regulating first ovulation, while the innervation arising from the MRN does not. This conclusion is similar to those proposed for the adult rat by Barofsky [5] and Héry et al. [10]. In turn, Morello and Taleisnik [19,20] suggest that this nucleus plays an inhibitory role in the regulation of gonadotropin secretion.

The delay on puberty onset observed in DRN sham-operated animals can be related to a delay in estrogen secretion by the ovary, induced by the exposure to the ether anesthesia or another manipulation associated with the stereotaxic surgery. Evidence showing that stress in any of the three levels of the hypothalamic-pituitary-gonadal axis can influence reproductive functions, supports such assumption [23]. In the adult rat, however, this type of stress results in an increase in estradiol concentration [6,26].

Another possibility is that the injection of ascorbic acid affected the neuronal activity of other systems present in the DRN; which in turn, modify ovarian innervation and the reactivity of the ovary to gonadotropins. According to Gerendai et al. [8], there is a neural communication between the ovary and several regions of the central nervous system. Another possibility is that the observed changes in puberty onset resulted from sectioning fibers during the needle introduction to reach the DRN or the MRN. Such possibility could also explain the differential effect on the onset of puberty observed in animals with a sham operation to the DRN or MRN.

According to Shannon et al. [24], electric stimulation to the DRN produces an increase in serotonergic activity of the POA-AHA. A similar increase in serotonergic activity in the anterior and medial hypothalami occurred after the lesion of the DRN. Such increase in serotonergic activity could be explained by an activity increase of other serotonergic pathway arriving to the hypothalamus, possibly from the MRN. Since the partial lesion to the DRN resulted in serotonergic activity increase in the anterior and medial hypothalami, the inhibitory participation of the MRN does not seem to be the main mechanism regulating the onset of puberty, and its participation is only evident in the absence of the DRN.

Normally, the FSH participates in the recruitment of follicles destined for ovulation [9], the observed decrease in

FSH serum concentration in rats with a complete lesion to the DRN could, therefore, explain the modifications in growth and maturation rate of the ovarian follicles, as well as the lack of ovulation observed in these animals. The changes in ovulation rate associated with the complete lesion to the DRN suggest that the serotonergic innervation arising from this nucleus plays a role in regulating the mechanism of FSH secretion. However, under present experimental conditions, we cannot discard the possibility that the complete lesion to the DRN also modified the pre-ovulatory secretion of LH on the previous day of the first vaginal estrus.

Injecting propranolol to rats with a complete lesion to the DRN restored ovulation, suggesting that the lesion affected other systems besides the serotonergic innervation of the hypothalamus. There is evidence that the LC receives serotonergic innervation from the DRN [31]. In addition, the mRNA for the 5-HT_{2C} receptor is present in the LC [33]. There is also evidence that the LC inhibits the LH release through the noradrenergic innervation of the anterior hypothalamus [20]. According to Maekawa et al. [16], stimulation of 5-HT_{2A/2C} receptors in adult rats with a thermal lesion to the DRN results in LH secretion and ovulation. However, according to Kordon et al. [14], the inhibitory effect of norepinephrine (NE) seen on pulsatile LH secretion in ovariectomized rats, is not detected during the normal regulation of LH, and these effects "are only seen after electrical stimulation of noradrenergic pathways or the intraventricular administration of NE or related agonists. In fact, in every instance when the β -antagonist propranolol was given to ovariectomized, proestrus or steroid-treated ovariectomized rats, not only did it not interfere with LH release but it also potentiate it. Therefore, inhibition of LH secretion, by NE via β -adrenergic neurons, does not appear to occur during these physiological states".

Furthermore, there is evidence that propranolol also blocks 5-HT_{1/5-HT2} receptors [1,28]. The restoration of ovulation observed in pre-pubertal rats with a complete lesion to the DRN and treated with propranolol could, therefore, be explained by different mechanisms, such as the increased blockade of some noradrenergic pathways related to ovulation control or by the decrease in serotonergic

activity induced by propranolol treatment, and/or by a combination of both these effects.

Because the projections of serotonergic neurons of the DRN reach different regions of the hypothalamus, the DRN is divided into medial, lateral, and caudal components [11]. Therefore, the differential effects on the number of ova shed by ovulating animals caused by the lateral or central lesion to the DRN, can be related to a differential participation of DRN serotonergic neurons regulating first ovulation. A thermal lesion to the lateral component of the DRN resulted in an increase in the number of ova shed [3], while the lesion performed with 5,6-DHT did not modify the number of ova shed. Such differences could be related to a lesion of some neural pathway present in the zone of the lesion or by the lesion of other kinds of neurons present in the nucleus.

Together, the findings presented in this paper provide evidence that during the pre-pubertal stage, the serotonergic innervation from the DRN plays a role in the mechanism regulating gonadotropin release and the onset of puberty. In turn, the MRN has no apparent role in the regulation of these processes.

Acknowledgements

DGPA Grant IN210500, CONACyT Grant IN1719, and PUIS supported this work. The generous gift of reagents for FSH and LH measurements by The National Hormone and Pituitary Programs is also acknowledged. The manuscript revision by M.S. Alvaro Domínguez is gratefully appreciated. We acknowledge Mrs. María L. Illescas for her technical assistance.

References

- [1] B.S. Alexander, M.D. Wood, Stereoselective blockade of central [³H]5-hydroxytryptamine binding to multiple sites (5-HT_{1A}, 5-HT_{1B} and 5-HT_{1C}) by mianserin and propranolol, *J. Pharm. Pharmacol.* 39 (1987) 664–666.
- [2] M.E. Ayala, J. Monroy, L. Morales, M.E. Castro, R. Domínguez, Effects of a lesion in the dorsal raphe nuclei performed during the juvenile period of the female rat, on puberty, *Brain Res. Bull.* 47 (1998) 211–218.
- [3] M.E. Ayala, P. Rosas, R. Domínguez, Different effects of unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation, *Brain Res. Bull.* 34 (1994) 27–30.
- [4] E.C. Azmitia, M. Segal, An autoradiographic analysis of the differential ascending projections of the dorsal and median raphe nuclei in the rat, *J. Comp. Neurol.* 179 (1978) 641–668.
- [5] A.L. Barofsky, Median raphe stimulation and sham procedures inhibit the LH surge, *Neuroendocrinology* 28 (1979) 358–370.
- [6] H. Cardenas, Effects of stress upon plasma estradiol and progesterone levels and the rate of oviductal embryo transport in the rat, *Biol. Res.* 25 (1992) 15–20.
- [7] M. Da Prada, L. Pieri, H.H. Keller, M. Pieri, E.P. Bonetti, Effects of 5,6-dihydroxytryptamine and 5,7-dihydroxytryptamine on the rat central nervous system after intraventricular or intracerebral application and on blood platelets in vitro, *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 305 (1978) 595–620.
- [8] I. Gerendai, I.E. Tóth, Z. Boldogkői, I. Medveczky, B. Halász, CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function, *J. Auton. Nerv. Syst.* 80 (2000) 40–45.
- [9] G.S. Greenwald, S.K. Roy, Follicular development and its control, in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd ed., Raven Press, New York, 1994, pp. 629–724.
- [10] M. Héry, E. Laplante, C. Kordon, 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 (1978) 1019–1025.
- [11] B.L. Jacobs, E.C. Azmitia, Structure and function of the brain serotonin system, *Physiol. Rev.* 72 (1992) 165–229.
- [12] L.R. Jennes, W.E. Beckman, W.E. Stump, R. Grzanna, Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus, *Exp. Brain Res.* 46 (1982) 331–338.
- [13] B. Kerdelhue, F. Bojda, P. Lesieur, C. Pasqualini, A. el Abed, V. Lenoir, P. Douillet, M.C. Chieuh, M. Palkovits, Medial eminence dopamine and serotonin neural activity. Temporal relationship to pre-ovulatory prolactin and luteinizing hormone surges, *Neuroendocrinology* 49 (1989) 176–180.
- [14] C. Kordon, S.V. Drouva, G. Martínez de la Escalera, R.I. Weiner, in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.), *The Physiology of Reproduction*, vol. 1, 2nd ed., Raven Press, New York, 1994, pp. 1621–1681.
- [15] A.P. Labhsetwar, Effects of serotonin on spontaneous ovulation in rats, *Nature* 229 (1971) 203–204.
- [16] F. Maekawa, S. Tsukahara, H. Tsukamura, K.-I. Maeda, K. Yamouchi, Prevention of inhibitory effect of dorsal raphe nucleus lesions on ovulation and LH surge by 5-HT_{2A/2C} receptor agonists in female rats, *Neurosci. Res.* 35 (1999) 291–298.
- [17] C.D. Meyer, Hypothalamic and raphe serotonergic systems in ovulation control, *Endocrinology* 103 (1978) 1067–1074.
- [18] H. Morello, L. Caligaris, B. Haymal, S. Taleisnik, Inhibition of proestrous LH surge and ovulation in rats evoked by stimulation of the medial raphe nucleus involves a GABA-mediated mechanism, *Neuroendocrinology* 50 (1989) 81–87.
- [19] H. Morello, S. Taleisnik, Changes of the release of luteinizing hormone (LH) on the day of proestrous after lesions or stimulation of the raphe nuclei in rats, *Brain Res.* 360 (1985) 311–317.
- [20] H. Morello, S. Taleisnik, 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 (1988) 227–231.
- [21] M.N. Parisi, M.L. Vitale, S.R. Chiochio, J.H. Tramezzani, Serotonin levels in rat median eminence change during the estrous cycle, *Acta Physiol. Latinoam.* 33 (1983) 89–91.
- [22] G. Paxinos, C. Watson, *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*, Academic Press, New York, 1982.
- [23] C. Rivier, S. Rivest, Effect of stress on the activity of the hypothalamic–pituitary–gonadal axis: peripheral and central mechanisms, *Biol. Reprod.* 45 (1991) 523–532.
- [24] N.J. Shannon, J.W. Gunnet, K.E. Moore, A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neural activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus, *J. Neurochem.* 47 (1986) 950–965.
- [25] N.M. Sherwood, P.S. Timiras, *A Stereotaxic Atlas of the Developing Rat Brain*, California University Press, Los Angeles, 1970.
- [26] T.L. Shors, J. Pickett, G. Wood, M. Paczynski, Acute stress persistently enhances estrogen levels in the female rat, *Stress* 3 (1999) 163–171.
- [27] T.R. Stratford, D. Wirtshafter, Ascending dopaminergic projections from the dorsal raphe nucleus in the rat, *Brain Res.* 511 (1990) 173–176.

- [28] J.C. Tinajero, A. Fabbri, M.L. Dufau, Serotonergic inhibition of rat Leydig cell function by propranolol, *Endocrinology* 133 (1993) 257–264.
- [29] I. Törk, Raphe nuclei and serotonin containing systems, in: G. Paxinos (Ed.), *The Rat Nervous System, Hindbrain and Spinal Cord*, vol. 2, Academic Press, New York, 1985, pp. 43–78.
- [30] L.D. Van de Kar, S.A. Lorens, Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and medial midbrain raphe nuclei, *Brain Res.* 162 (1979) 45–54.
- [31] R.P. Vertes, B. Kocsis, Projections of the dorsal raphe nucleus to the brainstem: PHAL-L analysis in the rat, *J. Comp. Neurol.* 340 (1994) 11–26.
- [32] M.J. Villar, S.R. Chiocchio, J.A. Tramezzani, Origin and termination of dorsal raphe-median eminence projection, *Brain Res.* 324 (1984) 165–170.
- [33] D.E. Wright, L. Jenness, Lack of expression of serotonin receptor subtype-1a, -1c, and -2 mRNA in gonadotropin-releasing hormone producing neurons of the rat, *Neurosci. Lett.* 163 (1993) 1–4.



**Sociedad Mexicana de
Ciencias Fisiológicas**

**XLVII Congreso Nacional de
Ciencias Fisiológicas
Boca del Río, Veracruz**



1 al 5 de Agosto de 2004



C-108

EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE P-CLOROANFETAMINA (PCA) EN LA ESTEROIDOGÉNESIS Y EN EL SISTEMA SEROTONINÉRGICO DEL HIPOTÁLAMO EN LA RATA MACHO PREPÚBER. Pérez Cañedo, J., Monroy Moreno, J., Aragón Martínez, A., Chavira Ramírez, R., Marín Téllez, M., Ayala Escobar, M.E., Domínguez Casala, R. *FES-Zaragoza, UNAM. *INCMN.

La serotonina (5-HT) modula la secreción de las gonadotropinas [hormona estimulante del folículo (FSH) y Luteinizante (LH)], las cuales regulan la esteroidogénesis en el testículo. La participación de la 5-HT en la modulación de la secreción de las gonadotropinas es diferente durante el desarrollo prepupal. Basados en estas observaciones decidimos analizar los efectos del bloqueo de la síntesis de 5-HT en la producción de progesterona (P) y testosterona (T) en la rata prepúber. Ratas macho de 30 días de edad recibieron 10 mg/kg de p.c. de PCA o solución salina (VH) cada 8 días. Los animales se sacrificaron a los 38 ó 45 días de edad. Se diseccionaron y pesaron los testículos (PT). En suero se cuantificó la concentración de P y T y en el hipotálamo anterior (HA) y medio (HM) la concentración de 5-HT y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA). En los animales que recibieron PCA se observó la disminución en el PT [38 días (0.97±0.24 vs. 1.15±0.82, NS); 45 días (1.10±0.14 vs. 1.54±0.07, p<0.05)]. La concentración de P y T no se modificó en ninguna de las edades. Mientras que, la concentración de 5-HT disminuyó en el HA [38 días (0.40±0.04 vs. 0.64±0.03); 45 días (0.48±0.13 vs. 1.4 ±0.1), p<0.05] y HM [38 días (0.56±0.08 vs. 0.77±0.14, NS); 45 días (0.29±0.03 vs. 1.32±0.075), p<0.05]. La concentración del 5-HIAA también disminuyó en el HA [38 días (0.4±0.05 vs. 0.72±0.09); 45 días (0.19±0.01 vs. 0.8 ±0.04), p<0.05]. Estos resultados, nos permiten sugerir que la 5-HT no participa en la modulación de la esteroidogénesis durante esta etapa del desarrollo prepupal de la rata macho. Apoyado por DGAPA IN210500 y CONACYT 403/A-1

C-109

EFFECTO DEL BLOQUEO DE LOS RECEPTORES A ESTRÓGENOS EN EL DIESTRO 2 (D2) O PROESTRO (P) SOBRE EL CRECIMIENTO FOLICULAR (CF) EN LA RATA ADULTA. Martínez Reyes, S., Carrillo Mejía, V., Ayala Escobar, M.E., Monroy Moreno, J., Cruz Beltrán, M.E., Damián Matsumura, P., Domínguez Casala, R. *FES-Zaragoza, UNAM. *UAM-Iztapalapa.

La selección de los folículos ováricos y su crecimiento es regulada por la hormona estimulante del folículo (FSH) y luteinizante (LH), cuya secreción es modulada por los esteroides entre otros factores. Previamente hemos mostrado que el bloqueo de los receptores a estrógenos por la administración de tamoxifen (TX) en D2 disminuyó la tasa de ovulación, mientras que la administración de TX en el P no la modificó. Por ello, en el presente trabajo se analizó si los cambios en la ovulación están asociados a modificaciones en el CF. Se utilizaron ratas cíclicas adultas tratadas de la siguiente forma: TX (2.5 mg/kg de peso) en el D2 (17:00 hrs) o P (9:00 hrs); VH: vehículo (aceite de maíz); TA: ratas intactas. Los animales fueron sacrificados en P a las 10:00, 13:00 ó 17:00 h. Se diseccionaron los ovarios, se fijaron y se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina, para realizar el análisis del CF. En suero se cuantificó la concentración de FSH y LH. En los animales inyectados con TX en el D2 o en P no se modificó el número total de folículos en las diferentes horas de sacrificio. Sin embargo el porcentaje de folículos atresicos se incrementó en los animales inyectados con TX en el D2 y sacrificados en P [10:00 h (66.7% vs. 23.2%); 13:00 h (81.7% vs. 27.1%); 17:00 h (64.6% vs. 23.5%), p<0.05]. Estos cambios se acompañaron de la disminución en la concentración de FSH y LH a las 17:00 h del P [FSH: 20.2857 + 4.066 vs. 43.8973 + 8.473; LH: 0.1357 + 0.05 vs. 19.3883 + 4.153, p<0.05]. En los animales inyectados en la mañana del P no se presentaron cambios. Estos resultados, permiten sugerir que el bloqueo de los receptores a estrógenos en D2 modifica la secreción preovulatoria de las gonadotropinas y como consecuencia se incrementa la atresia folicular. Apoyado por DGAPA IN210500 y CONACYT 403/A-1.

C-110

EL BLOQUEO DE LA OVULACIÓN INDUCIDO POR LA LESIÓN QUÍMICA DEL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ (NDR) ES RESTABLECIDO POR LA ESTIMULACIÓN DEL SISTEMA NORADRENÉRGICO EN LA RATA PREPUBER. Monroy Moreno, J., Ayala Escobar, M.E., Chavira Ramírez, R., Domínguez Casala, R. *FES-Zaragoza, UNAM.

La secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas, de las gonadotropinas y la ovulación son reguladas por el sistema serotoninérgico. La inervación serotoninérgica del hipotálamo se origina en neuronas localizadas en los núcleos del rafé. La inyección de 10 ml de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en el NDR de la rata de 30 días edad, bloquea la primera ovulación. Para analizar si la falta de ovulación es el resultado de modificaciones en el sistema noradrenérgico, se analizaron los efectos de la inyección 6 mg/kg i.p. de isoproterenol (ISO) a animales con lesión del NDR sobre la pubertad (edad de apertura vaginal y primer estro), ovulación, las concentraciones séricas de progesterona (P4) y 17 β -estradiol (E2) y en la actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo anterior (HA), medio (HM) y posterior (HP). Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron sacrificados en el día del primer estro vaginal. No se observaron diferencias significativas en la edad de la apertura (43.6 ± 0.8 vs. 44.1 ± 11.1, NS) y del primer estro vaginal (45.8 ± 0.9 vs. 46.0 ± 1.5, NS) y en la actividad de la neurona serotoninérgica en el HA (0.7 ± 0.5 vs. 0.7 ± 0.06, NS), HM (0.7 ± 0.1 vs. 0.7 ± 0.05, NS) y HP (0.9 ± 0.2 vs. 0.5 ± 0.05, NS). En los animales con lesión y tratados con ISO se restableció la tasa de animales ovulantes (4/8 vs. 0/11). La concentración sérica de P4 y E2 se incrementó (P4: 3.5 ± 0.4 vs. 2.1 ± 0.4; E2: 111.6 ± 10.3 vs. 37.4 ± 4.3, p<0.05). Con base en los resultados obtenidos sugerimos que la inervación serotoninérgica que se origina en el NDR ejerce un efecto estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la primera ovulación por medio del sistema noradrenérgico. Apoyado por DGAPA IN210500, DGEP, PUIS y CONACYT.

C-111

LA ADMINISTRACIÓN DE LIDOCAÍNA INDUCE LA FORMACIÓN DE ESPECIES REACTIVAS DEL OXÍGENO EN LA AMÍGDALA DE RATAS ADULTAS. ORTIZ BUTRINO, R., ZAMORA MORALES, I., CANO EUROPA, E., PEREZ SEVERIANO, F., SANTA MARIA, A. *Departamento de Fisiología * Mauricio Russek ENCB *Departamento de Neuroquímica, INNnY. *Lab. de Aminoácidos Excitadores, INNnY.

Se sabe que la administración de lidocaína a pesar de ser empleada como anestésico local, puede provocar convulsiones. El objetivo del presente trabajo es cuantificar el grado de generación de especies reactivas del oxígeno (ROS) en la región de la amígdala, al inducir crisis convulsivas con lidocaína. Se emplearon ratas macho de la cepa Wistar con un peso promedio de 200-300g y se dividieron en dos grupos: Ratas a las que se les administró intraperitonealmente lidocaína (n=7) en una dosis de 60 mg/Kg/día. Ratas control (n=7) a las que se les administró por vía intraperitoneal solución salina isotónica (0.9%). La lidocaína o la solución salina, fueron administradas diariamente a todos los animales. Las ratas se observaron durante 45 minutos después de la administración de la solución respectiva. La observación continuó si desarrollaban crisis convulsivas hasta la recuperación. Se consideró que un animal llegó al estado "kindled" cuando presentó convulsiones tónico-clónicas dos días consecutivos. Los animales se sacrificaron por decapitación, se obtuvo el cerebro y se separó la región de la amígdala. Se realizó un homogenizado y se mantuvo a -70°C. Se evaluaron las especies reactivas del oxígeno (ROS) usando el diacetato de 2', 7'-diclorofluoresceína (DCFH-DA), el cual es de-esterificado por la presencia de peróxido de hidrógeno produciendo una molécula más oxidada (2',7'-diclorofluoresceína o DCF), la cual es capaz de fluorescer. Los valores obtenidos se interpolaron en una curva tipo de diclorofluoresceína (DCF). Los valores de proteínas de cada muestra se utilizaron para expresar los resultados DCF formado/hrs/mg proteína total. Se encontró que el 33% de las ratas del grupo de ratas tratadas con lidocaína presentaron movimientos intermitentes clónicos mientras que un 67% presentaron convulsiones tónicas de los miembros anteriores y posteriores. Además encontramos que la administración sistémica de lidocaína provocó un aumento de la formación de especies reactivas en un 541.57% con respecto al control. Nuestros resultados indican que al inducir crisis convulsivas con lidocaína se provoca un aumento en la formación de especies reactivas al oxígeno lo cual nos sugiere que existe un riesgo potencial de estrés oxidativo. a: becario de DEDICT-COFAA; b: becario de PIFI-IPN.