



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

**EFEECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE TAMOXIFEN EN  
LOS DÍAS DEL DIESTRO 2 O PROESTRO SOBRE LA  
OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA ADULTA**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

**B I Ó L O G O**

P R E S E N T A

**SERGIO MARTÍNEZ REYES**

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR



MÉXICO, D. F.

MAYO DE 2005

m345550



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 MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**“ZARAGOZA”**

**EFFECTO DE LA ADMINISTRACIÓN DE TAMOXIFEN EN LOS DÍAS DEL  
DIESTRO 2 O PROESTRO SOBRE LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA  
ADULTA**

**Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: Sergio Martínez Reyes**

**Directora de Tesis: Dra. María Elena Ayala Escobar**

**Tesis realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción,  
Laboratorio de Pubertad de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.**

**Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA clave  
210500.**

## AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su excepcional dirección en la elaboración de esta tesis.

A los revisores de la tesis y miembros del jurado:

Dr. Roberto Domínguez Casalá

Dra. María Elena Ayala Escobar

M. C. Raúl Zavala Chavero

Dra. María Esther Cruz Beltrán

Dra. Leticia Morales Ledesma

Mi más sincero agradecimiento a cada uno por designar un espacio en su agenda para enriquecer esta tesis.

A la Dra. Juana Monroy Moreno por su colaboración en la realización de la técnica de radioinmunoanálisis.

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

Al Dr. Andrés Aragón Martínez por su orientación en los diversos temas relacionados con la reproducción y por su colaboración en los procedimientos de disección.

A Victoria Esther Carrillo Mejía por su respaldo en el marcaje, toma de frotis, sacrificio y disección de los animales.

Al personal del Bioterio de la F. E .S. Zaragoza por su cooperación en el mantenimiento de los animales.

A Miriam, Diana, Eloir, Julio, Abel y Juan Luis por su apoyo constante.

## DEDICATORIAS

A mis padres, Alejandro y Ofelia, por todo el amor y apoyo brindados desde el día que nací.

A mi hermana, Thelma, y mi cuñado Raúl, por estar a mi lado incondicionalmente.

A Cari, por obsequiarme su amor y llenar mi vida de alegría.

A mi familia en Santa María Mazatla, gracias por todo su cariño.

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su entereza, sin usted no lo habría logrado.

A todos y cada uno de los miembros del H. Cubo, gracias por su amistad.

## ÍNDICE

|   |    |
|---|----|
| Resumen   | I  |
| Introducción                                      | 1  |
| Aparato reproductor de la hembra de los mamíferos | 1  |
| Crecimiento folicular                             | 1  |
| Esteroidogénesis                                  | 5  |
| Ciclo Estral                                      | 7  |
| Eje hipotálamo-hipófisis-ovario                   | 10 |
| Estrógenos y eje hipotálamo-hipófisis-ovario      | 12 |
| Tamoxifen   | 17 |
| Justificación                                     | 21 |
| Hipótesis   | 22 |
| Objetivos   | 22 |
| Materiales y Métodos                              | 23 |
| Resultados  | 26 |
| Discusión   | 41 |
| Conclusiones                                      | 46 |
| Bibliografía                                      | 47 |

## RESUMEN

Entre los mecanismos que regulan el ciclo reproductivo en los mamíferos, los estrógenos tienen una importancia fundamental, ya que sus capacidades de acción endocrina o parácrina están involucradas con la mayoría de los órganos relacionados con la reproducción. De este modo los estrógenos, en coordinación con otros mecanismos, están implicados en la síntesis y secreción de la GnRH en el hipotálamo, en el proceso de producción y secreción de las gonadotropinas en la hipófisis, en el desarrollo de los órganos sexuales y también autorregulan su propia biosíntesis a nivel ovárico. Sin embargo, este amplio campo de acción se halla condicionado a la presencia de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos en el órgano blanco. La expresión de ARNm para estos receptores, al igual que la concentración de estrógenos, se expresa de manera diferencial según el tejido a estudiar y la etapa del ciclo estral en que se encuentre el animal. Este hecho hace posible pensar que al bloquear los receptores a estrógenos en la tarde del diestro 2 o en la mañana del proestro se ocasionan efectos diferenciales en la ovulación espontánea de la rata adulta. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la administración de tamoxifen (TX) en el diestro 2 (D2) o proestro (P) sobre ovulación espontánea, la secreción de gonadotropinas, hormonas esteroides, y la atresia folicular en la rata adulta. Se utilizaron ratas cíclicas adultas tratadas de la siguiente forma: inyección subcutánea de TX (2.5mg/kg de peso) a las 17:00 h del D2 o a las 09:00 h del P; inyección de vehículo (VH) y ratas intactas (TA). Los animales tratados en D2 fueron sacrificados en P a las 10:00, 13:00 ó 17:00 h o en estro a las 10:00 h, mientras que los tratados en P se sacrificaron el mismo día a las 13:00 ó 17:00 o en estro (E) a las 10:00 h.

En los animales a los que se administró el tamoxifen en la mañana del diestro 2 se observó que disminuyó de manera significativa la tasa ovulatoria (3/9 vs. 9/10,  $p < 0.05$ ) y que se inhibieron los picos preovulatorios de FSH ( $20.3 \pm 4.7$  vs.  $43.9 \pm 8.5$ ), LH ( $0.2 \pm 0.1$  vs.  $19.4 \pm 4.2$ ) y progesterona ( $12.9 \pm 3.5$  vs.  $32.5 \pm 3.6$ ) en los animales sacrificados en P a las 17:00 h. También se observó una disminución en la concentración de testosterona en

los animales sacrificados en P a las 13:00 h ( $0.06 \pm 0.01$  vs.  $0.09 \pm 0.02$ ) y que la concentración de  $17\beta$ -estradiol no presentó el descenso normal en su concentración en la mañana del estro ( $53.4 \pm 14.1$  vs.  $23.4 \pm 2.7$ ). El número total de folículos presentes en los ovarios de estos animales no tuvo modificación, sin embargo la incidencia de atresia se incrementó significativamente en todos los grupos de estudio: P 10:00 h (66.7% vs. 23.2%); P 13:00 h (81.7% vs. 27.1%); P 17:00 h (64.6% vs. 23.5%); E 10:00 h (56.8% vs. 39.1%).

La administración del tamoxifen en la mañana del proestro no modificó el número de animales ovulantes ni la concentración preovulatoria de LH, esto a pesar de la inhibición de los picos de FSH ( $10 \pm 1.6$  vs.  $31.4 \pm 7.5$ ). La concentración de testosterona mostró valores disminuidos a las 13:00 h del proestro ( $0.03 \pm 0.1$  vs.  $0.13 \pm 0.3$ ) que se incrementan a las 17:00 h de la misma etapa ( $0.13 \pm 0.03$  vs.  $0.08 \pm 0.02$ ). El tratamiento no tuvo efecto sobre el número total de folículos y el porcentaje de folículos atrésicos tampoco tuvo modificación.

En conjunto, los resultados de este estudio permiten sugerir que los efectos del bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos sobre la concentración de progesterona, testosterona,  $17\beta$ -estradiol, gonadotropinas y sobre el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico dependen de la etapa del ciclo estral en que se realice el tratamiento.

## INTRODUCCIÓN

La reproducción es el proceso mediante el cual se producen nuevos individuos a partir de los ya existentes. Este proceso está regulado por diversos factores ambientales como la luz, la temperatura, el suministro adecuado de alimento, las relaciones sociales (tales como la presencia del sexo opuesto o de otros animales) y otros factores, que al actuar aisladamente o en combinación, son los responsables de regular los ritmos reproductivos de los animales (Schwartz, 2000). En los mamíferos, la reproducción implica la maduración de los componentes del aparato reproductor y cambios conductuales, los cuales son el resultado de la interacción de los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada (Ferin, 1999).

### **Aparato reproductor de la hembra de los mamíferos**

El aparato reproductor de la hembra de los mamíferos está formado por dos ovarios, dos oviductos, el útero, la vagina, los genitales externos y las glándulas mamarias. De estos componentes, el ovario se define como el órgano primario debido a que por medio de la secreción de sus hormonas esteroideas (estrógenos y progesterona), proteicas (inhibina y activina) y factores de crecimiento regula la estructura y funcionamiento de otros órganos sexuales, a los que se les denomina secundarios (Geneser, 1999; Yao y Bahr, 1999).

El ovario desempeña dos funciones: una es la producción y liberación de ovocitos viables con el complemento cromosómico característico de la especie en forma haploide (n), y la otra función es la secreción de hormonas. Ambas funciones están encaminadas a la procreación y mantenimiento de la especie (Yao y Bahr, 1999).

### **Crecimiento folicular**

Según algunos autores la formación de los folículos ováricos, así como su desarrollo en etapas iniciales son procesos independientes de la acción de las gonadotropinas, ya que

extirpados a ratas de dos días de edad y colocados en medio de cultivo sin dichas hormonas (Peters y col., 1973). Sin embargo, otros estudios muestran que la administración diaria de antisuero a gonadotropinas desde el día del nacimiento induce alteraciones en el desarrollo folicular que son detectables desde el día cinco de edad (Lunenfeld y col., 1975). Al respecto, Greenwald y Roy (1994) consideran que aunque algunos folículos logran desarrollarse de manera normal en ausencia de gonadotropinas, este fenómeno no es significativo en términos cuantitativos.

*Folículos primordiales.* La mayoría de los folículos ováricos pertenecen a este tipo. Están formados por un ovocito y una capa circundante de células epiteliales aplanadas, llamadas células foliculares (Fig. 1). El ovocito es una célula redonda, con un núcleo también redondo, que se localiza en posición excéntrica y contiene uno o más nucleolos grandes. En este tipo de folículo, el ovocito se encuentra en la profase de la primera división meiotica y las células foliculares que rodean al ovocito no se dividen (Geneser, 1999; Ross y col., 1997, Hirshfield, 1997).

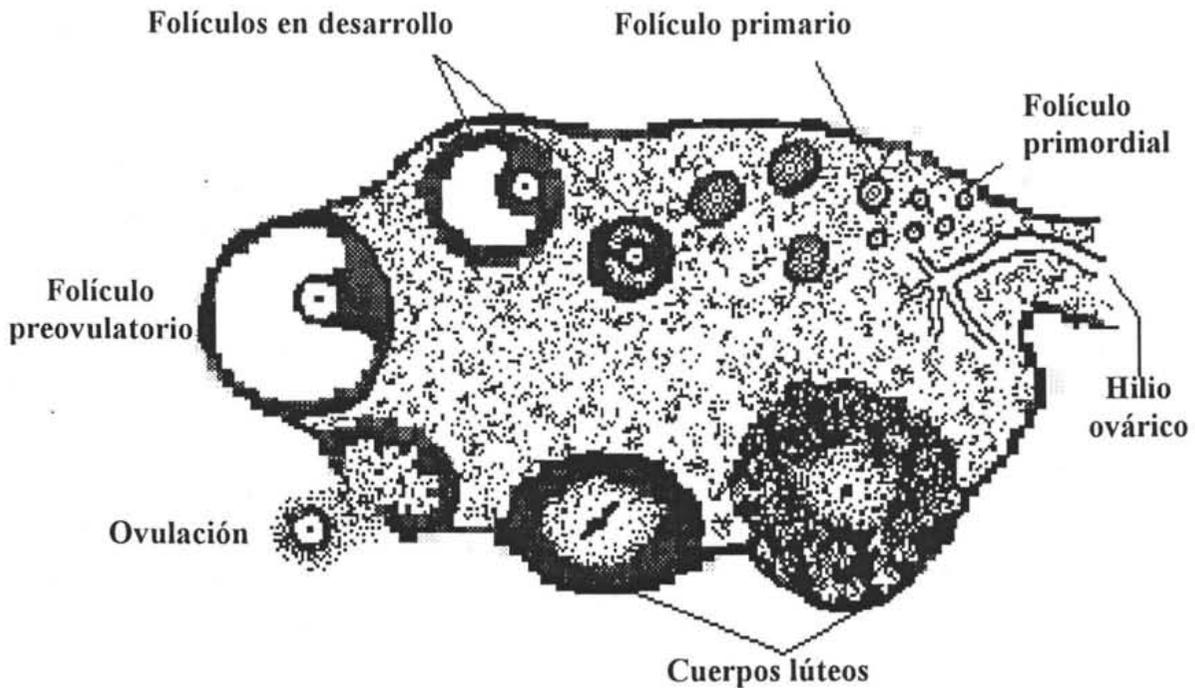
*Folículos primarios.* En este tipo de folículo el ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares adquieren un aspecto granular, por ello se denominan células de la granulosa. Se ha mostrado que la diferenciación y mitosis de estas células es estimulada por la FSH, ya que al cultivar folículos ováricos de rata o de ratón en medios con esta hormona, las células de la granulosa se multiplican hasta formar varias capas de células, mientras que este evento no sucede en los cultivos sin la hormona (Van Voorhis, 1999).

A medida que crece el ovocito, entre éste y las células de la granulosa, se desarrolla la zona pelúcida, compuesta por glucoproteínas secretadas por el propio ovocito. Durante el crecimiento del folículo las células del estroma circundante conforman una capa concéntrica, la teca folicular (Geneser, 1999; Ross y col., 1997; Schwartz, 2000; Hirshfield, 1997).

*Foliculos secundarios.* En esta etapa continúa la proliferación de células de la granulosa y se constituyen varias capas de células alrededor del ovocito. Posteriormente, entre las células de la granulosa aparecen pequeñas zonas llenas de líquido, las cuales aumentan de tamaño, se fusionan y dan origen a una cavidad denominada antro folicular (Geneser, 1999). El ovocito adopta una posición excéntrica y es rodeado por varias capas de células de la granulosa que forman el cumulus oophorus. En esta etapa, la teca folicular se diferencia en interna y externa. Esta última capa está formada por células de tejido conectivo, células musculares lisas y haces de fibras de colágeno. La teca interna es una capa muy vascularizada y las células que la forman expresan receptores a LH y secretan andrógenos a partir del colesterol. Los andrógenos producidos en la teca se difunden hacia las células de la granulosa, en donde la testosterona es convertida en estradiol por efecto de la enzima aromatasa (Geneser, 1999).

*Folículo maduro o preovulatorio.* Está constituido por varias capas de células de la granulosa, un ovocito en posición excéntrica y el antro que se halla completamente desarrollado y lleno de líquido folicular (Fig. 1). El ovocito ha alcanzado su tamaño máximo y está rodeado por la zona pelúcida y una capa de células de la granulosa que se denomina corona radiada (Geneser, 1999; Hirshfield, 1997).

Muy pocos de los folículos ováricos que inician su diferenciación están destinados a completar su maduración. La mayor parte de los folículos degeneran y desaparecen por un proceso denominado atresia folicular que puede ocurrir en cualquier etapa del desarrollo. El folículo que inicia el proceso de atresia presenta alteraciones morfológicas y bioquímicas (Greenwald y Roy, 1994). Morfológicamente los folículos atrésicos se distinguen por presentar involución del ovocito, picnosis en las células de la granulosa y pérdida de las uniones entre estas células (Van Voorhis, 1999; Ross y col., 1997).



**Figura 1. Esquema de un ovario donde se distinguen diferentes etapas de desarrollo folicular (Modificado de Yao y Bahr, 1999).**

En los foliculos que presentan estas alteraciones se encuentran altas concentraciones de andrógenos, los cuales son factores inductores de la atresia folicular (Van Voorhis, 1999; Ross y col., 1997). Se ha mostrado que el tratamiento de ratas con andrógenos, como la testosterona o la dihidrotestosterona (DHT) o con gonadotropina coriónica humana (hCG) que estimula la producción endógena de andrógenos, promueve la atresia folicular (Bagnell y col., 1982); mientras que la administración de antiandrógenos rescata a los foliculos ováricos del proceso de atresia (Teerds y col., 1993).

Las hormonas esteroides son consideradas reguladores intraováricos del crecimiento y la diferenciación de los foliculos. Cuando se administra el  $17\beta$ -estradiol a ratas hembras, se estimula la proliferación de las células de la granulosa de los foliculos en desarrollo y se rescata a los foliculos que han iniciado la atresia. Los foliculos dominantes adquieren la capacidad de sintetizar y secretar el estradiol que ellos mismos requieren para su futuro desarrollo. Esto lo logran debido a la cooperación que existe entre las células de la teca y de la granulosa. Las células de la teca sintetizan andrógenos (androstenediona y testosterona),

los cuales son aromatizados a estrógenos por las células de la granulosa (Carson y col., 1981).

## **Esteroidogénesis**

Durante el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico, éste adquiere la capacidad de sintetizar y liberar esteroides sexuales (esteroidogénesis). La hormona luteinizante (LH) y la hormona estimulante de los folículos (FSH) son requeridas para que se lleve a cabo este proceso. Mannaerts y col. (1994), mostraron que en ratas prepúberes hipofisectomizadas, la administración de FSH estimula el desarrollo folicular hasta la etapa preovulatoria; sin embargo, las concentraciones de estrógenos en circulación permanecen bajas. Estos resultados apoyan la idea de que se requiere la participación de ambas gonadotropinas en la síntesis de esteroides por el folículo (Greenwald y Roy , 1994).

En las células de la teca interna del folículo ovárico se producen andrógenos a partir del colesterol. Los folículos obtienen el colesterol de tres fuentes: a) de las lipoproteínas en sangre; b) del colesterol almacenado en las células foliculares o c) la síntesis de colesterol por las mismas células foliculares (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).

El primer paso en la síntesis de las hormonas esteroides es la formación de la pregnenolona, que es estimulada por la unión de la LH a sus receptores de membrana en las células de la teca, lo que da como resultado la activación de la enzima adenilato ciclasa que induce la formación del adenosin monofosfato cíclico (AMPC), que activa al complejo enzimático citocromo P<sub>450</sub> que cataliza la formación de la pregnenolona a partir del colesterol (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).

Existen dos rutas en la síntesis de esteroides que se denominan  $\Delta_5$  y  $\Delta_4$ . En la ruta  $\Delta_5$  la pregnenolona se transforma a 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona por acción de la enzima 17 $\alpha$ -hidroxilasa. Posteriormente la C<sub>17,20</sub>-liasa transforma este compuesto en dehidroepiandrosterona (DHEA). En la ruta  $\Delta_4$  la pregnenolona se transforma a progesterona y a partir de esta se forma la 17-hidroxiprogesterona. Esta última hormona por

acción de la C<sub>17-20</sub> liasa se biotransforma a androstenediona que se convierte a testosterona (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).

La androstenediona y testosterona difunden a través de la membrana basal y llegan a las células de la granulosa donde son aromatizadas a estrógenos por el complejo enzimático P<sub>450</sub>-aromatasa, que se activa como resultado de la unión de la FSH a sus receptores de membrana. La androstenediona se transforma en estrona y la testosterona en 17β- estradiol. La enzima 17β-HSD, también transforma a la estrona en estradiol (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).

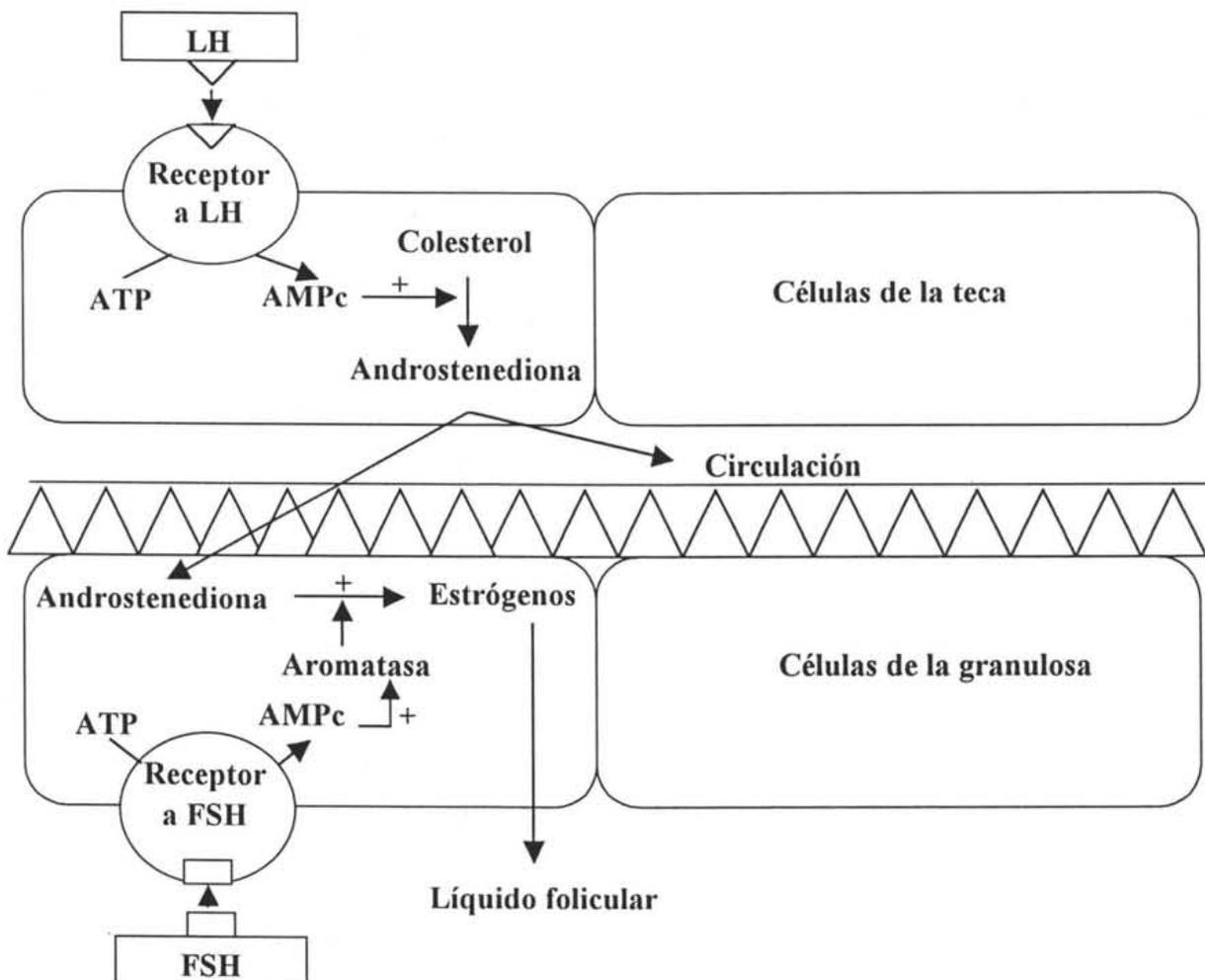


Figura 2. Síntesis de hormonas esteroideas a partir del colesterol. LH, hormona luteinizante; FSH, hormona foliculo estimulante; ATP, trifosfato de adenosina; AMPc, monofosfato de adenosina cíclico (Modificado de Yoshinaga, 1999) .

Además de la participación de las gonadotropinas en la modulación de la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis de los esteroides, este proceso también es regulado por otros factores como la prolactina, que regula la secreción de andrógenos por las células de la teca. El EGF y el IGF-1 estimulan la síntesis de pregnenolona y progesterona. Así mismo se ha mostrado que la noradrenalina también ejerce un papel modulador en el proceso de esteroidogénesis debido a que estimula la síntesis de progesterona (Gore-Langton y col., 1994). La inhibina interviene en la regulación de la producción de andrógenos en las células de la teca. Otro regulador intraovárico que interviene es el óxido nítrico que modula la secreción de estradiol por las células de la granulosa (Van Voorhis, 1999).

### **Ciclo estral**

Durante la etapa reproductiva de la hembra de los vertebrados tanto la síntesis como la liberación de las gonadotropinas y los esteroides ováricos, así como la estructura del ovario y la conducta sexual tienen variaciones periódicas. Estos cambios cíclicos que se presentan en la hembra reciben el nombre de ciclo estral, en los roedores y otros mamíferos. En la rata hembra durante todo el año se presentan ciclos estrales cuya duración varía de cuatro a cinco días dependiendo de la cepa de estudio. En las ratas que presentan ciclos de cuatro días de duración, para su estudio se divide en: diestro-1 (metaestro), diestro-2, proestro y estro. En ratas con ciclos de cinco días, se puede presentar un tercer día de diestro, una fase de proestro-estro o dos de estro (Schwartz, 2000).

El estudio de la citología vaginal mediante la toma de frotis, es una herramienta adecuada para el monitoreo del ciclo estral de la rata y otros animales, debido a que se ha mostrado que el epitelio de la vagina responde a los cambios en las concentraciones hormonales que se presentan durante el ciclo estral (Kilen y Schwartz, 1999).

En el día del diestro 1, la citología vaginal se caracteriza por presentar leucocitos y en el ovario se observan los cuerpos lúteos de la ovulación más reciente, los cuales secretan progesterona aproximadamente desde las 08:00 h de esta etapa hasta las 06:00 h del día

siguiente. En algunos animales esta secreción puede extenderse y producir el alargamiento de hasta un día en la duración del ciclo. En esta fase se presenta un ligero incremento en la concentración de FSH que estimula el desarrollo folicular que, a su vez, se refleja en un aumento en la secreción de estradiol por parte de los folículos en desarrollo, por lo que la concentración sérica de esta hormona se incrementa (Schwartz, 2000; Kilen y Schwartz, 1999).

En el día de diestro 2 se observan leucocitos en el frotis vaginal; en el ovario se encuentran cuerpos lúteos de ovulaciones anteriores y folículos en desarrollo, mientras que en el suero las concentraciones de gonadotropinas se mantienen en concentraciones basales, pero suficientes para estimular el crecimiento de los folículos y la secreción de estrógenos, los cuales aumentan conforme crecen los folículos. Si el desarrollo de los folículos continúa, se incrementa de manera significativa la síntesis y liberación del estradiol a partir de las 17:00 h de este día (Fig. 2). Los estrógenos actúan en el hipotálamo entre otras estructuras del sistema nervioso central, en la hipófisis y otros órganos blanco como son el útero, la vagina y en el propio ovario (Schwartz, 2000; Kilen y Schwartz, 1999).

En la etapa de proestro, el frotis vaginal se caracteriza por presentar células epiteliales nucleadas. En el ovario se encuentran folículos preovulatorios, los cuales tienen la mayor capacidad de síntesis de estrógenos. Bajo la influencia del incremento en la concentración de esta hormona en suero (17:00 h del proestro) se induce la mayor producción de FSH y LH de todo el ciclo, “pico preovulatorio de gonadotropinas”, que induce la maduración final del folículo y la ovulación en la mañana del siguiente día (estro). A las 16:00 h del proestro se incrementa la secreción de progesterona y conjuntamente con el estradiol induce el comportamiento de apareamiento en la rata hembra (Schwartz, 2000; Kilen y Schwartz, 1999).

En el día siguiente, estro, el frotis vaginal presenta células epiteliales cornificadas y sin núcleo. Aproximadamente a las 01:00 h de este día culmina la degradación de la pared del folículo ovárico y se lleva a cabo la ovulación, después de este evento las células foliculares se luteinizan y se forma el cuerpo lúteo, estructura del ovario que sintetiza y

secreta progesterona. Esta hormona estimula el crecimiento y la actividad secretora del endometrio y lo prepara para la implantación del, o los, cigotos si es que se llevó a cabo la fecundación. Cuando no se produce la fecundación el cuerpo lúteo sufre luteólisis y deja de secretar la progesterona. Entre las 01:00 y las 04:00 h del día del estro se presenta un segundo aumento en la secreción de la FSH, pico secundario de FSH (Fig. 2), que al parecer es necesario para que un nuevo grupo de folículos inicie su desarrollo (Schwartz, 2000; Geneser, 1999; Ross y col., 1997; Kilen y Schwartz, 1999).

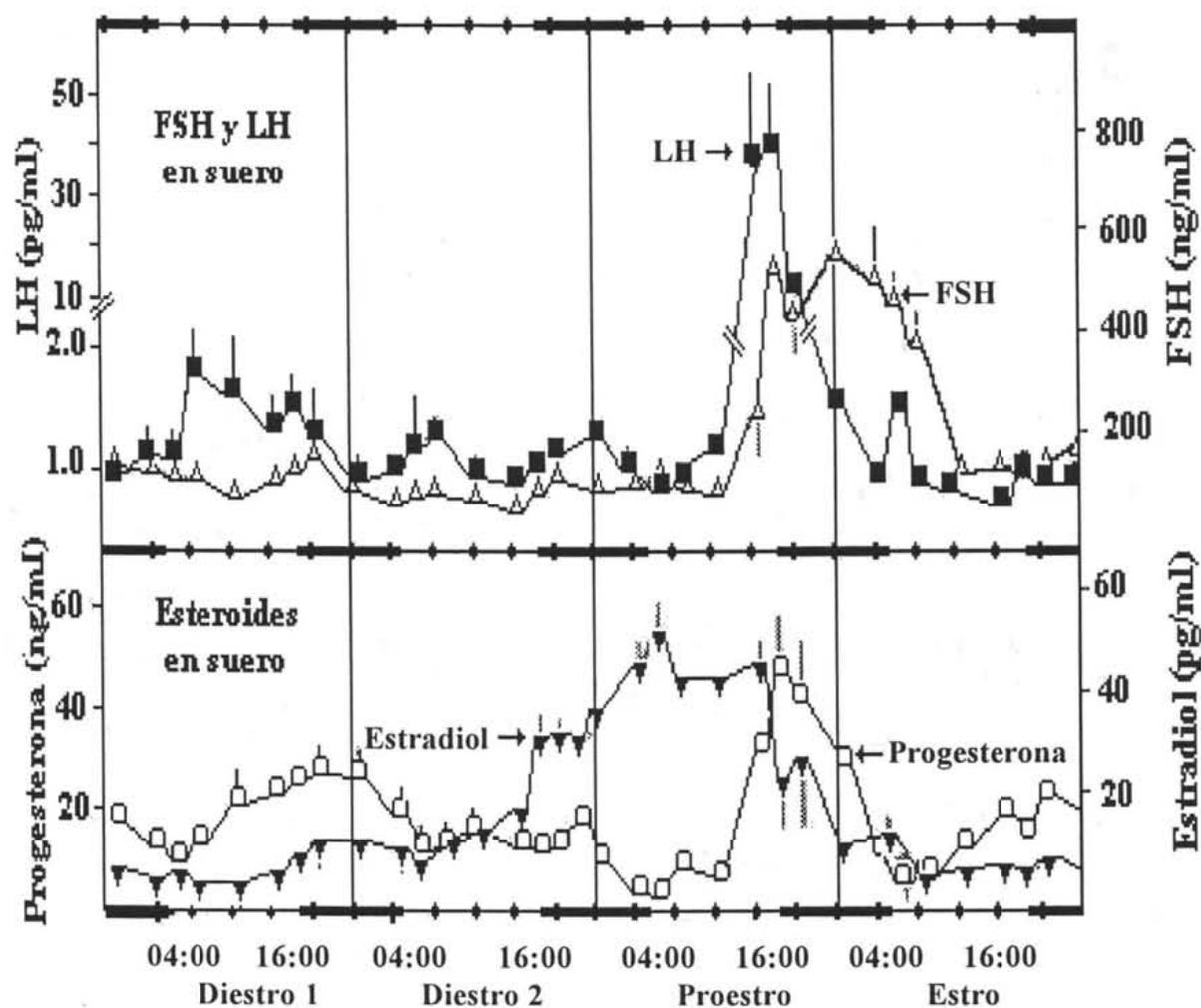


Figura 2. Cambios en la concentración de hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH); progesterona y estradiol en suero durante el ciclo estral de la ratona. Las barras negras en la escala de tiempo indican períodos de oscuridad (Modificado de Schwartz, 2000).

## Eje hipotálamo-hipófisis

Los mecanismos que regulan las funciones del ovario dependen especialmente de la interrelación de los eventos neuroendócrinos en los que están involucrados el hipotálamo y la hipófisis (Counis, 1999).

El hipotálamo está formado por grupos de neuronas que se denominan núcleos, los cuales se encuentran en pares, uno a cada lado del tercer ventrículo (Brown, 1994). Los diferentes núcleos hipotalámicos envían y reciben inervación de la corteza cerebral, el tálamo, partes del sistema límbico y la médula espinal. Esta estructura también cuenta con irrigación sanguínea, mediante la cual se transportan diferentes mensajeros químicos que modulan el funcionamiento de la hipófisis por intermedio de la síntesis de factores liberadores o inhibidores de las hormonas hipofisarias y de las propias células hipotalámicas (Brown, 1994).

En el hipotálamo se han identificado neuronas que secretan la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), que se denominan GnRHérgicas y se localizan en el área preóptica, los núcleos preóptico medial, anterior, ventromedial y arcuato, así como la estría terminal y la banda diagonal de Broca (Yen, 1999; Roth, 2001; Silverman y col. 1994). Estas neuronas envían sus proyecciones a la eminencia media, donde liberan la GnRH hacia el sistema porta-hipofisiario, donde es transportada hacia la adenohipófisis. En esta glándula la GnRH se une a sus receptores en los gonadotropos y estimula la síntesis y secreción de las gonadotropinas (Brown, 1994). En los roedores se considera que existen dos centros que regulan la secreción de las gonadotropinas. En el núcleo arcuato y en el ventromedial se ubican las neuronas cuya actividad estimula la secreción tónica o basal de las gonadotropinas. Las neuronas del área preóptica medial constituyen el centro que regula la secreción fásica de la FSH y la LH como consecuencia del incremento en la secreción de estrógenos. Tanto la liberación tónica de las gonadotropinas como la liberación fásica

presentan un patrón de secreción pulsátil. La amplitud y frecuencia de estos pulsos aumenta en la tarde del día del proestro. (Yen, 1999).

Con base en diversos estudios anatómicos mediante el uso de técnicas de inmunohistoquímica se ha mostrado que existe una interacción entre los axones de los diferentes sistemas de neurotransmisión y el soma o terminales de las neuronas que secretan la GnRH (Smith y Jennes, 2001). Este hecho apoya la idea de que existe una interrelación funcional entre los diferentes sistemas de neurotransmisión y las neuronas GnRHérgicas. Así mismo, los estrógenos secretados por los folículos en desarrollo, actúan sobre el hipotálamo y la hipófisis donde regulan la secreción de la GnRH y las gonadotropinas. Entre los neurotransmisores que modulan la secreción de la GnRH se encuentran la noradrenalina, dopamina, serotonina, acetilcolina, ácido  $\gamma$ -amino butírico (GABA), péptidos (neuropéptido Y), opioides, y aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato (Kordon y col., 1994) (Fig. 3).

Los resultados de estudios *in vivo* e *in vitro* apoyan la idea de que los diferentes sistemas de neurotransmisión participan en la regulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas (Brown, 1994; Müller y Nistico, 1989; Simpkins y col. 1985; Steger y Morgan, 1985). Sin embargo, los resultados generados hasta el momento son contradictorios debido a la diversidad de modelos y a lo inespecífico de algunos agonistas o antagonistas utilizados en estos estudios. Así mismo, los efectos estimulantes o inhibitorios que se le atribuyen a algunos sistemas de neurotransmisión, como el serotoninérgico, dependen del ambiente hormonal del animal, de la zona de estudio o del lugar de origen de la innervación que recibe el hipotálamo (Kordón y col. 1994; Monroy y col. 2003).

Además de la interrelación funcional que existe entre las neuronas que secretan la GnRH y los sistemas de neurotransmisión, la actividad de las neuronas de dichos sistemas se encuentra bajo control de las hormonas esteroides (Brown, 1994).

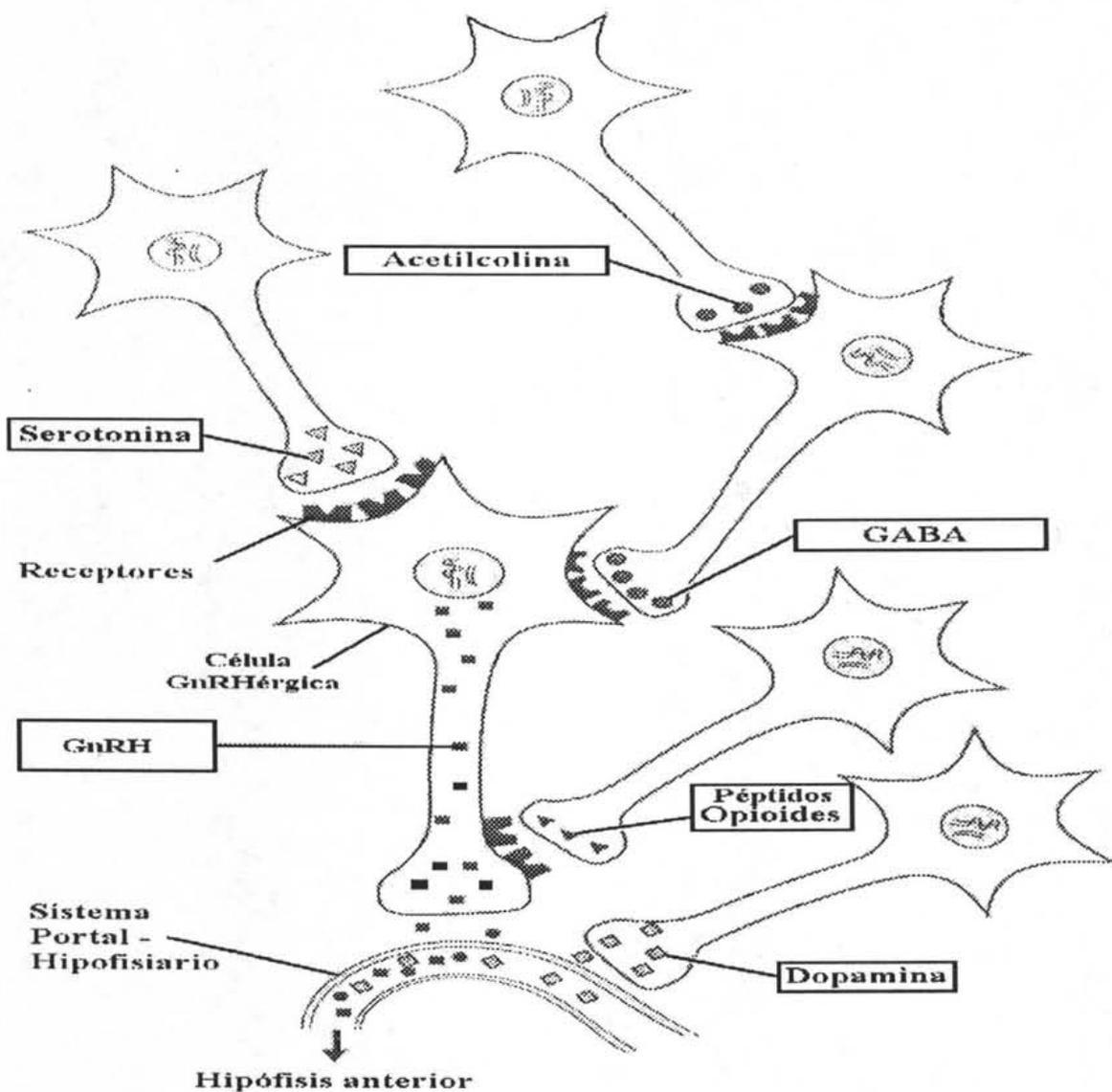


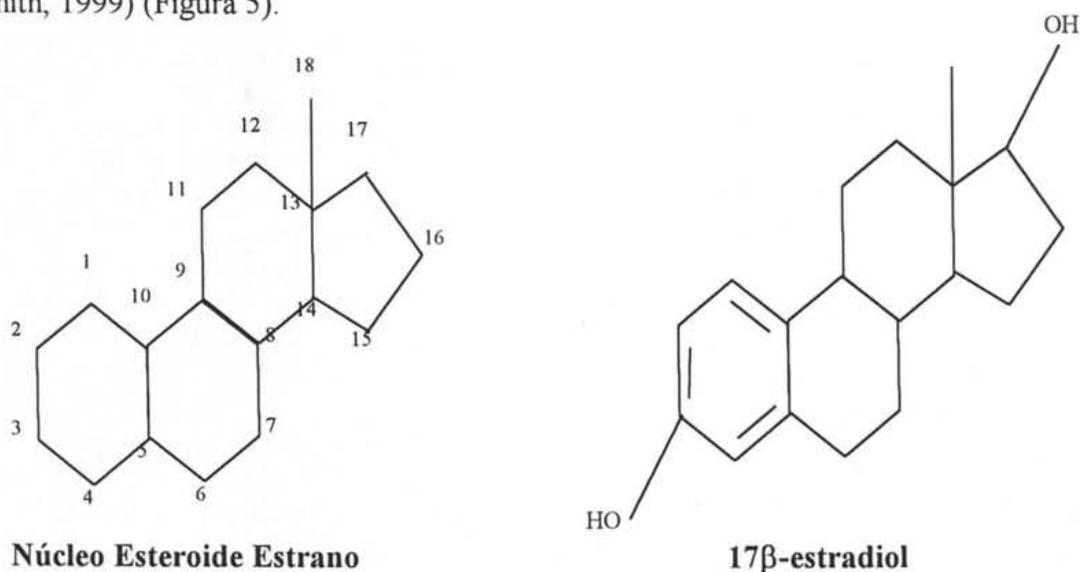
Figura 3. Interrelación de la neurona productora de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) con los diferentes sistemas de neurotransmisión (Modificado de Brown, 1994).

### Estrógenos y eje hipotálamo-hipófisis-ovario

En la década de los veinte se realizaron una serie de experimentos que trajeron consigo la propuesta de que algunas sustancias producidas por el ovario mantenían la estructura o funcionamiento de diferentes órganos del aparato reproductor de la hembra (útero y vagina). En 1924, Allen y Doisy, mostraron que el fluido folicular del ovario de la

cerda causa cronificación vaginal en la rata. Posteriormente en 1929 Corner y Allen observaron que los extractos de cuerpos lúteos de cerdas causa proliferación celular en el útero de coneja. Estas observaciones permitieron a los autores sustentar la idea de que las secreciones del ovario regulan el funcionamiento del aparato reproductor. La naturaleza de tales secreciones era desconocida, sin embargo a partir de estos y otros hallazgos se realizaron los estudios para aislar e identificar a los estrógenos y la progesterona (Clark y Sahilaja 1994). Otros investigadores demostraron que los estrógenos también estimulan la actividad mitótica de las células epiteliales del oviducto y del útero, así como la síntesis del receptor a progesterona (Linsdey y Korach , 1999).

Los estrógenos son compuestos orgánicos con un núcleo de 18 átomos de carbono agrupados en cuatro anillos, este núcleo se conoce como núcleo esteroide estrano. El estrógeno de mayor actividad en el organismo es el  $17\beta$ -estradiol que contiene un grupo hidroxilo en el carbono tres y otro en el carbono 17 que se denomina grupo  $17\beta$ -hidroxilo (Smith, 1999) (Figura 5).



**Figura 5. Estructuras químicas del núcleo esteroide estrano y del  $17\beta$ -estradiol (Smith, 1999).**

Otro de los avances en el estudio de la participación de los estrógenos en la modulación de la función reproductiva fueron los descubrimientos de que esta hormona también podría estar actuando sobre el hipotálamo y la hipófisis. Everett en 1948, encontró que en ratas con ciclos de 5 días de duración, la administración de benzoato de estradiol adelanta la ovulación 24 horas. Estas evidencias permitieron sustentar la importancia de estas hormonas en el control de la ovulación. Posteriormente Hillarp en 1949 y Flerkó en 1974, mostraron que en ratas adultas intactas la administración de estrógenos estimula la secreción de la LH y la ovulación, pero este efecto no se observa en los animales con lesión del área preóptica hipotalámica anterior o del núcleo supraquiasmático. También se mostró que en la rata prepúber el implante de estrógenos en el hipotálamo anterior induce la ovulación (Döcke y Dörner, 1965). En conjunto estas evidencias apoyan la idea de que los estrógenos participan en la modulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

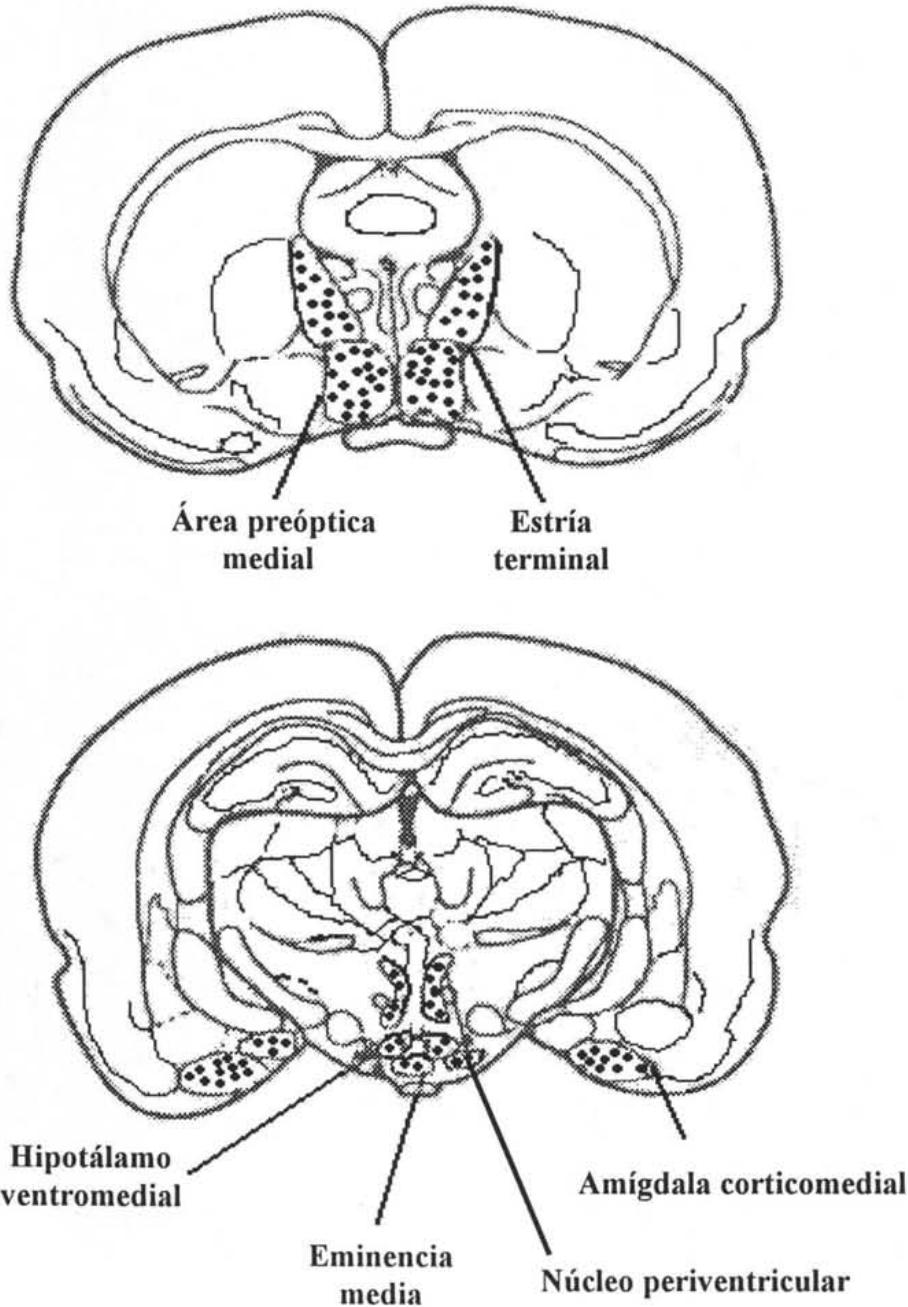
Anteriormente se consideraba que las hormonas esteroides modulaban la secreción de GnRH de forma indirecta, vía los sistemas de neurotransmisión. Esta idea se basaba en el hecho de que con las técnicas disponibles no se habían identificado receptores a estrógenos en las neuronas GnRHérgicas (Shivers y col., 1983). Sin embargo, recientemente se mostró que las neuronas que producen la GnRH también contienen receptores a estrógenos (Skynner y col., 1999), por lo que es posible pensar que los estrógenos también participan en la modulación de la síntesis y secreción de la GnRH, al actuar directamente en la célula productora de la neurohormona.

En estudios *in vivo* e *in vitro* se han generado resultados que apoyan la idea de que los estrógenos actúan en hipófisis, en donde regulan el número de los receptores a la GnRH en los gonadotropos y la actividad de los mismos (Bellido y col., 2003; Gregg y col., 1990; McArdle y col., 1992). Döcke y Dörner (1965) mostraron que en la rata hembra, los implantes de estrógenos en la hipófisis estimulan la secreción de las gonadotropinas. Posteriormente Piacsek y Meites (1966) observaron que cuando se mantiene en cultivo

tejido hipofisiario de rata y se le adiciona al medio estradiol, la concentración de LH se incrementa una hora después de la administración de la hormona, aún sin administrar GnRH al medio. Además se ha reportado que el implante de antiestrógenos en la hipófisis anterior inhibe la liberación de FSH y LH (Billard y McDonald, 1973). Más tarde en 1989, Cover y Buckingham observaron que al cultivar células adenohipofisarias de ratas ovariectomizadas, éstas no responden a dosis repetidas de GnRH, excepto cuando se agrega estrógenos al medio.

En el hipotálamo, la hipófisis, el ovario y otros tejidos, los estrógenos ejercen su acción al unirse a sus receptores, de los cuales existen dos tipos: los  $\alpha$  y los  $\beta$  (RE- $\alpha$  y RE- $\beta$  respectivamente). Los RE son proteínas compuestas de seis dominios funcionales que se denominan de la A hasta la F. Cuando los estrógenos se unen al receptor, este último sufre un cambio estructural y se forma el complejo hormona esteroide-receptor, que se une a una secuencia específica del ácido desoxirribonucleico (ADN) y se inicia el proceso de transcripción del ADN y la formación del ácido ribonucleico mensajero (ARNm) (McDonnell, 1999; Yen, 1999).

El ARNm del receptor  $\beta$  de los estrógenos está distribuido en el área preóptica medial y en los núcleos periventricular, paraventricular, supraóptico, arcuato, medial tuberal y mamilar (Hrabovsky y col., 2000). Mientras que el ARNm del receptor  $\alpha$ , se ha identificado en el área preóptica medial, en los núcleos arcuato y ventromedial (Butler y col, 1999). Otros investigadores han mostrado en las zonas rostrales del cerebro anterior (estria terminal, núcleo medial de la amígdala, y el núcleo preóptico peri-ventricular, e incluso el área preóptica) la existencia de neuronas GnRH que co-expresan el ARNm para ambos tipos de receptores a estrógenos; otras que sólo expresan el ARNm para el receptor a estrógenos  $\beta$  y otras el del  $\alpha$  (Fig. 6) (Shughrue y col., 1996).



**Figura 6.** Corte coronal de cerebro en el que se muestra la distribución de los receptores a estrógenos en las diferentes regiones hipotalámicas (Modificado de Brown, 1994).

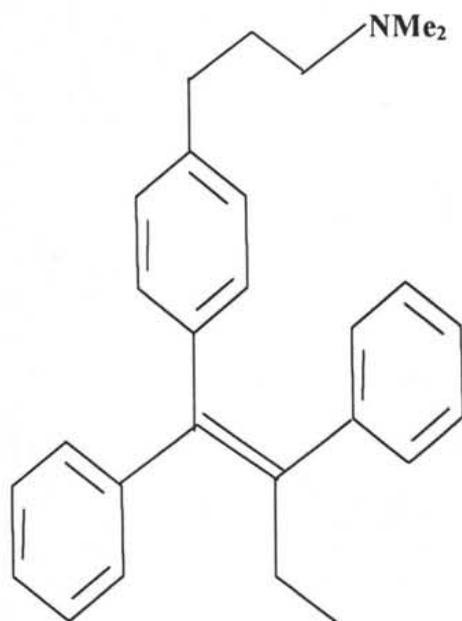
En la rata la expresión de los receptores a estrógenos varía a lo largo del ciclo estral y esta variación se da de forma asimétrica en los lados izquierdo y derecho de las áreas preóptica anterior e hipotalámica anterior (POA-AHA). En el lado derecho de POA-AHA,

la expresión del ARNm del receptor  $\alpha$  alcanza su máximo a las 17:00 h del estro, con otros dos incrementos de menor magnitud a las 09:00 h del día de diestro 2 y a las 13:00 h del proestro. En el lado izquierdo la expresión del ARNm para el receptor  $\alpha$  prácticamente no se modifica a lo largo del ciclo estral y únicamente se presenta un pico a las 13:00 h del proestro. La expresión del ARNm del receptor  $\beta$  se incrementa en ambos lados de POA-AHA en el día del diestro 2, en el lado derecho a las 09:00 h y en el izquierdo a las 13:00 h (Arteaga-López y col., 2003). Es factible que la expresión diferencial de los receptores a estrógenos a lo largo del ciclo estral se asocie con la modulación que ejercen los estrógenos sobre la síntesis preovulatoria de GnRH.

Para el estudio del papel que tienen las dos isoformas de receptores a los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas y la ovulación de la rata, se han utilizado agonistas o antagonistas de los mismos, tanto en el animal adulto como en el prepúber (Pinilla y col. 2001).

### **Tamoxifen**

El tamoxifen es un bloqueador no esteroide de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  a estrógenos (Fig. 7), por lo que impide que se manifiesten los efectos biológicos de estas hormonas en sus órganos blanco (Kim y col., 2002). Sus efectos en el eje hipotálamo-hipófisis han sido estudiados utilizando como modelos a gallinas, primates y ratas, en diferentes etapas de su desarrollo (Wilson y Cunningham, 1981; Tarantal y col., 1993; Ketani y col., 2002). En los modelos mencionados, el tamoxifen se ha administrado de manera oral y subcutánea. En la rata, la inyección subcutánea es más efectiva en la inhibición de la actividad estrogénica, ya que cuando el tamoxifen se administra por vía oral es metabolizado rápidamente por el hígado (Gill-Sharma y col., 2001).



**Figura 7. Estructura química del tamoxifen (McDonell, 1999).**

Los resultados de los efectos de la administración de tamoxifen pueden ser estrogénicos o antiestrogénicos, dependiendo de las condiciones del organismo receptor. Si el organismo carece de estrógenos, como las ratas ovariectomizadas, se ha observado que la administración de tamoxifen incrementa el peso uterino y disminuye el número de receptores a progesterona en el hipotálamo (Patisaul, 2003); también se ha reportado que, en contraste con otros bloqueadores a estrógenos, el tamoxifen incrementa el contenido de receptores a estrógenos en los gonadotropos e induce la síntesis de GnRH (Bellido y col., 2003); además en ratas ovariectomizadas, el tamoxifen también incrementa la secreción de LH estimulada por GnRH y la síntesis de prolactina (González y col., 2000).

Sin embargo, cuando el organismo posee la capacidad de sintetizar y liberar estrógenos se presenta un fenómeno totalmente opuesto al anterior. El tamoxifen interfiere con la actividad estrogénica de manera específica en el eje hipotálamo-hipófisis (Gao y col., 2002; Yen, 1999). En este sentido Prevot y col. (1999) observaron que el tamoxifen inhibe el estímulo que ejercen los estrógenos en células de la eminencia media y que es

necesario para la liberación de la GnRH. Wilson y Handa (1998) mostraron que en los gonadotropos de ratas hembras en la etapa infantil responden directamente a las hormonas esteroides, por ello el tratamiento con tamoxifen de estas células da como resultado la inhibición de la secreción de FSH y puede inhibir también la secreción de LH, dependiendo del día del tratamiento.

Según Sánchez-Criado y col. (2002) la administración de tamoxifen a ratas hembra reduce la secreción basal de LH así como la estimulada por GnRH. Donath y Nishino (1998) también observaron la reducción del pico preovulatorio de LH, pero mostraron además que se inhiben los picos preovulatorios de FSH y progesterona. Gao y col. (2002) observaron que el fármaco, al inhibir los picos preovulatorios de gonadotropinas, inhibe también la ovulación.

Nathwani y col. (2000) mostraron que el tamoxifen bloquea la regulación que ejercen los estrógenos sobre el receptor a GnRH en células del cuerpo lúteo, lo cual concuerda con el estudio de Kang y col. (2001) quienes mostraron que en la línea celular OVCAR-3 (en el estudio del cáncer ovárico), el tamoxifen inhibe los efectos de los estrógenos sobre el desarrollo de estas células.

En los machos, la inyección de tamoxifen da como resultado una reducción en la concentración de LH, testosterona, pregnenolona, 5- $\alpha$ -DHT y estrógenos y por lo tanto disminuye el índice de fertilidad (Parte y col., 2000). Así mismo, se ha observado que la administración del fármaco reduce los pesos de testículo, epidídimo, próstata y vesícula seminal (Gill-Sharma y col., 2001).

Estas mismas propiedades antiestrogénicas han hecho que el tamoxifen haya sido utilizado por más de veinte años para tratar pacientes con cáncer de mama, ya que los estrógenos promueven el crecimiento de las células cancerosas al interactuar con los RE con que cuentan estas células (Ickenstein y Bandiera, 2002; Ketani y col., 2002). En el

tratamiento de esta enfermedad el tamoxifen también se ha utilizado en combinación con otros fármacos, principalmente antagonistas de GnRH para producir un “bloqueo estrogénico combinado” (Robertson y Blamey, 2003). El tratamiento de alteraciones espermatogénicas constituye otro campo de aplicación del tamoxifen (Krause y col., 1985).

## JUSTIFICACIÓN

Los estrógenos ejercen un papel fundamental en el ciclo reproductivo, ya que actúan como señal endocrina en el hipotálamo (en donde regulan la secreción de la GnRH), en la hipófisis y en otros órganos blanco (como el útero o los órganos sexuales internos y externos) o como señal parácrina en el ovario, donde estimulan el desarrollo y la mitosis de las células de la granulosa, lo cual da como resultado el incremento de la síntesis de estradiol, por lo que esta hormona también autorregula su síntesis. Todas estas acciones se pueden llevar a cabo gracias a la presencia de los RE  $\alpha$  y  $\beta$  en los tejidos mencionados. Sin embargo se sabe que las concentraciones de estrógenos y del ARNm para estos receptores se expresa de manera diferencial según el tejido a estudiar y la etapa del ciclo estral en que se encuentre el animal. Durante el diestro 2, día en que la concentración plasmática de estradiol comienza a aumentar hacia las 17:00 horas, la expresión del ARNm para el RE $\beta$  en el área preóptica-hipotalámica anterior es baja respecto al máximo observado a las 09:00 y 13:00 horas del mismo día del ciclo. En cambio, la expresión del ARNm para el RE $\alpha$  permanece baja desde las 13:00 horas de ese día. La cantidad de ARNm para ambos receptores a estrógenos sigue siendo baja en la mañana del proestro, momento en el que la concentración sérica de estradiol alcanza su valor máximo.

Por lo tanto en el presente estudio se decidió analizar los efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos en la tarde del diestro 2 o en la mañana del proestro sobre la secreción de gonadotropinas, hormonas esteroides, ovulación espontánea en la rata y la atresia folicular.

## HIPÓTESIS

La expresión de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ , así como el efecto estimulante de los estrógenos sobre la secreción preovulatoria de GnRH y gonadotropinas inician en la tarde del diestro 2 y finalizan en la noche de proestro; por ello en la rata adulta, el bloqueo de los receptores en la tarde del diestro 2 o en la mañana del proestro provocará efectos diferenciales en la ovulación espontánea, secreción de gonadotropinas y el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos.

## OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos del bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos en la tarde del diestro 2 o en la mañana del proestro en la ovulación espontánea, secreción de gonadotropinas y crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos en la rata adulta.

## OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar en la rata hembra los efectos del bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos en la tarde del diestro 2 o en la mañana del proestro sobre la ovulación espontánea y el número de ovocitos liberados.
- Analizar en la rata hembra los efectos del bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos en la tarde del diestro 2 o en la mañana del proestro sobre la concentración sérica de gonadotropinas.
- Analizar en la rata hembra los efectos del bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos en la tarde del diestro 2 o en la mañana del proestro sobre la concentración sérica de esteroides sexuales.
- Analizar en la rata hembra los efectos del bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos en la tarde del diestro 2 o en la mañana del proestro en el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra adultas de la cepa CIIZ-V, con pesos corporales de 190 a 230 g, mantenidas en condiciones controladas de iluminación (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso al alimento (Purina, Harlan de México) y al agua.

Los animales se mantuvieron en grupos de seis por caja y se les realizó diariamente la toma de frotis vaginales, los cuales se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina. Sólo se utilizaron aquellos animales que presentaron tres ciclos consecutivos de cuatro días de duración. Los animales se dividieron al azar en los siguientes grupos experimentales: animales que recibieron aceite de maíz (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO, USA) por vía subcutánea (grupo con VH) a las 17:00 h del diestro 2 o a las 09:00 h del proestro; otro grupo de animales fueron tratados con 2.5 mg/ Kg de peso corporal de tamoxifen (bloqueador de los receptores a estrógenos  $\alpha$  y  $\beta$ ) (Sigma Chemical Co., St., Louis, MO, USA) por vía subcutánea (grupo con TX) en los días y horarios antes mencionados. Como grupo de comparación se utilizaron animales sin tratamiento (grupo TA).

### **Procedimiento de autopsia**

Los grupos de animales que se inyectaron en diestro se sacrificaron por decapitación a las 10:00, 13:00 ó 17:00 horas del día del proestro o a las 10:00 horas del estro del mismo ciclo. Los grupos de animales tratados en proestro se sacrificaron el mismo día a las 13:00 ó 17:00 h, o en estro a las 10:00 h. Los grupos de animales sin tratamiento se sacrificaron en los días y horarios mencionados para los animales tratados con tamoxifen o con vehículo.

Inmediatamente después de la decapitación se colectó la sangre del tronco y se dejó coagular por 30 minutos a temperatura ambiente, posteriormente se centrifugó a 3000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante (suero) se separó y almacenó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta la cuantificación de FSH y LH y hormonas esteroides (progesterona, testosterona y  $17\text{-}\beta$  estradiol) por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA).

También se extrajeron, disecaron y pesaron los ovarios y el útero; el peso de los órganos se expresó como peso absoluto, en miligramos (mg), o como peso relativo (mg/100g de peso corporal). Los ovarios se fijaron en líquido de Bouin para su posterior estudio morfométrico. Los oviductos se disecaron, revisaron y con la ayuda de un microscopio estereoscópico se contó el número de ovocitos en su interior.

### **Cuantificación de gonadotropinas**

Las concentraciones séricas de FSH y LH se cuantificaron utilizando reactivos y protocolo proporcionado por National Hormone and Pituitary Program (Baltimore, MD, USA). Los anticuerpos empleados fueron rFSH-RP2 y rLH-RP3, respectivamente. La concentración de estas gonadotropinas se expresó en ng/ml de suero.

### **Cuantificación de hormonas esteroides**

La cuantificación de progesterona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, para lo cual se utilizó un estuche comercial de reactivos (Coat-A-Count, Los Ángeles, California, USA). La concentración de progesterona y testosterona se expresó en ng/ml de suero y la de estradiol en pg/ml de suero.

### **Estudio morfométrico**

En el ovario izquierdo y derecho de tres animales tomados al azar de cada grupo experimental, se realizó el estudio del crecimiento folicular. Los ovarios se fijaron en

solución de Bouin, se deshidrataron e incluyeron en parafina y se realizaron cortes seriados de 10  $\mu\text{m}$  de grosor, que se tiñeron con hematoxilina-eosina. Los cortes se revisaron cada 100  $\mu\text{m}$  y en todos los folículos que presentaron bien definidos el núcleo y el nucleolo del ovocito se midió, con un ocular micrométrico filar, el diámetro mayor ( $D_1$ ) y el perpendicular a éste ( $D_2$ ). El diámetro promedio ( $D_p$ ) se calculó con la siguiente relación:  $D_p = D_1 + D_2 / 2$ .

Con base en su diámetro promedio los folículos se clasificaron en:

Folículos pequeños:  $< 349 \mu\text{m}$ ,

Folículos medianos:  $350-499 \mu\text{m}$

Folículos preovulatorios:  $> 500 \mu\text{m}$

Los folículos también se clasificaron en sanos o atrésicos. Un folículo se consideró atrésico cuando presentó alguna de las siguientes características: picnosis de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa hacia el antro folicular, engrosamiento de la teca o alteración del ovocito.

### **Análisis estadístico**

Los resultados de número de ovocitos se analizaron por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba de "U" de Mann-Witney. La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovularon/total de animales) se analizó por la prueba de probabilidad exacta de Fisher. El número de folículos fue analizado por la prueba de "U" de Mann-Whitney. La concentración de LH, FSH, progesterona, testosterona y 17- $\beta$ -estradiol en suero, se analizaron por la prueba de Análisis de Varianza Múltiple (ANDEVA), seguida de la prueba de Tukey. Los resultados de porcentajes de folículos sanos o atrésicos se analizaron por la prueba de Ji Cuadrada. En todos los casos se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue  $\leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### *Peso corporal y de los órganos*

En aquellos animales que se inyectaron con VH a las 17:00 h del diestro 2, el peso corporal, de los ovarios y del útero (peso absoluto y relativo) fue similar a los del grupo testigo absoluto. En los animales que recibieron vehículo a las 09:00 h del proestro y se sacrificaron a las 10:00 h del estro, el peso corporal y peso absoluto de los ovarios fue significativamente menor que en los animales testigo absolutos (Cuadros 1 y 2).

En los animales con inyección de TX las 17:00 h del diestro 2 y sacrificados en estro, el peso absoluto y relativo del útero fue significativamente menor que el de los animales que recibieron VH (Cuadros 1 y 2).

En los grupos tratados con VH o TX a las 09:00 h del proestro y sacrificados en el día del estro se observó una disminución significativa del peso absoluto de los ovarios (Cuadro 1).

### *Ovulación y ciclo estral*

La administración de VH en los días de diestro 2 o proestro no modificó la tasa de animales ovulantes. En comparación con el grupo de animales TA o que recibió VH, la administración de tamoxifen en la tarde del diestro 2 resultó en una disminución significativa del número de animales que ovularon en el día del estro. La administración del fármaco en la mañana del proestro no modificó la proporción de animales que ovularon en el día del estro. El número de ovocitos liberados por animal ovulante, al igual que el ciclo estral, no se modificó en ninguno de los grupos (Cuadro 3).

**Cuadro 1. Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal, masa ovárica y peso del útero de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día del diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o en la mañana del estro.**

| Grupo                  | n  | Peso corporal (g) | Peso de Ovarios (mg) | Peso del Útero (mg) |
|------------------------|----|-------------------|----------------------|---------------------|
| <b>Inyección en D2</b> |    |                   |                      |                     |
| P (10:00)              |    |                   |                      |                     |
| TA                     | 10 | 267 $\pm$ 4.9     | 77.7 $\pm$ 4.01      | 441 $\pm$ 31.5      |
| VH                     | 8  | 255 $\pm$ 6.5     | 66.2 $\pm$ 2.8       | 475 $\pm$ 30.1      |
| TX                     | 9  | 249 $\pm$ 7       | 64.2 $\pm$ 2.5 a     | 487 $\pm$ 29.3      |
| P 13:00 h              |    |                   |                      |                     |
| TA                     | 10 | 255 $\pm$ 9.4     | 69.9 $\pm$ 2.8       | 486 $\pm$ 28        |
| VH                     | 7  | 245 $\pm$ 2.8     | 66.7 $\pm$ 1.3       | 473 $\pm$ 15.9      |
| TX                     | 7  | 260 $\pm$ 10.5    | 70.4 $\pm$ 2.6       | 487 $\pm$ 39.9      |
| P 17:00 h              |    |                   |                      |                     |
| TA                     | 10 | 249 $\pm$ 6.2     | 72.4 $\pm$ 4.3       | 428 $\pm$ 41.6      |
| VH                     | 7  | 257 $\pm$ 6.5     | 75.7 $\pm$ 4         | 446 $\pm$ 17.5      |
| TX                     | 7  | 249 $\pm$ 3.5     | 71.9 $\pm$ 3.9       | 429 $\pm$ 23.9      |
| E 10:00 h              |    |                   |                      |                     |
| TA                     | 10 | 259 $\pm$ 7.9     | 80.6 $\pm$ 2.3       | 410 $\pm$ 9.1       |
| VH                     | 10 | 243 $\pm$ 7.7     | 71.6 $\pm$ 3.5       | 388 $\pm$ 13.6      |
| TX                     | 10 | 253 $\pm$ 5.6     | 63.3 $\pm$ 2.6a      | 337 $\pm$ 11.3 a,b  |
| <b>Inyección en P</b>  |    |                   |                      |                     |
| P 13:00 h              |    |                   |                      |                     |
| TA                     | 10 | 255 $\pm$ 9.4     | 69.9 $\pm$ 2.8       | 486 $\pm$ 28        |
| VH                     | 9  | 243 $\pm$ 5.6     | 64.1 $\pm$ 1.9       | 455 $\pm$ 22.5      |
| TX                     | 9  | 242 $\pm$ 4.4     | 69.8 $\pm$ 2.3       | 501 $\pm$ 17.6      |
| P 17:00 h              |    |                   |                      |                     |
| TA                     | 10 | 249 $\pm$ 6.2     | 72.4 $\pm$ 4.2       | 428 $\pm$ 41.6      |
| VH                     | 10 | 241 $\pm$ 3.5     | 67.7 $\pm$ 2.1       | 482 $\pm$ 12.3      |
| TX                     | 10 | 244 $\pm$ 5.2     | 69.9 $\pm$ 2.7       | 499 $\pm$ 30.1      |
| E 10:00 h              |    |                   |                      |                     |
| TA                     | 10 | 259 $\pm$ 8       | 80.6 $\pm$ 2.3       | 410 $\pm$ 9.2       |
| VH                     | 10 | 236 $\pm$ 5.7 a   | 67.3 $\pm$ 3.3 a     | 425 $\pm$ 20.6      |
| TX                     | 10 | 238 $\pm$ 6 a     | 62.5 $\pm$ 2.2 a     | 371 $\pm$ 18.4      |

a,  $p < 0.05$  vs grupo TA ; b,  $p < 0.05$  vs grupo con VH (ANDEVA seguida de Tukey)

**Cuadro 2. Media  $\pm$  e.e.m. del peso relativo (mg/100g de p.c.) de los ovarios y del útero de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día del diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o en la mañana del estro (10:00 h).**

| Grupo                  | n  | Ovarios          | Útero             |
|------------------------|----|------------------|-------------------|
| <b>Inyección en D2</b> |    |                  |                   |
| P (10:00)              |    |                  |                   |
| TA                     | 10 | 28.9 $\pm$ 1.4   | 166 $\pm$ 11.8    |
| VH                     | 8  | 26.1 $\pm$ 1.1   | 188 $\pm$ 13.9    |
| TX                     | 9  | 25.9 $\pm$ 0.8   | 197 $\pm$ 11.9    |
| P 13:00 h              |    |                  |                   |
| TA                     | 10 | 27.5 $\pm$ 0.8   | 190 $\pm$ 6.9     |
| VH                     | 7  | 27.2 $\pm$ 0.8   | 193 $\pm$ 6.3     |
| TX                     | 7  | 27.3 $\pm$ 1.2   | 191 $\pm$ 5.1     |
| P 17:00 h              |    |                  |                   |
| TA                     | 10 | 29.2 $\pm$ 1.4   | 174 $\pm$ 7.2     |
| VH                     | 7  | 29.4 $\pm$ 1.1   | 174 $\pm$ 6.4     |
| TX                     | 7  | 28.9 $\pm$ 1.7   | 172 $\pm$ 9.4     |
| E 10:00 h              |    |                  |                   |
| TA                     | 10 | 31.4 $\pm$ 1.3   | 160 $\pm$ 5.1     |
| VH                     | 10 | 29.4 $\pm$ 0.9   | 161 $\pm$ 5.7     |
| TX                     | 10 | 25.1 $\pm$ 1.1 a | 134 $\pm$ 4.5 a,b |
| <b>Inyección en P</b>  |    |                  |                   |
| P 13:00 h              |    |                  |                   |
| TA                     | 10 | 27.5 $\pm$ 0.8   | 190 $\pm$ 6.9     |
| VH                     | 9  | 26.5 $\pm$ 1.1   | 187 $\pm$ 8.2     |
| TX                     | 9  | 28.9 $\pm$ 1.1   | 207 $\pm$ 8.1     |
| P 17:00 h              |    |                  |                   |
| TA                     | 10 | 29.2 $\pm$ 1.4   | 174 $\pm$ 17.2    |
| VH                     | 10 | 28.2 $\pm$ 1.1   | 200 $\pm$ 6.4     |
| TX                     | 10 | 28.7 $\pm$ 1.1   | 206 $\pm$ 13.9    |
| E 10:00 h              |    |                  |                   |
| TA                     | 10 | 31.4 $\pm$ 1.3   | 160 $\pm$ 5.1     |
| VH                     | 10 | 28.2 $\pm$ 1.3   | 180 $\pm$ 8.2     |
| TX                     | 10 | 26.3 $\pm$ 0.8 a | 159 $\pm$ 10.4    |

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

**Cuadro 3. Tasa de animales ovulantes (TAO) y número de ovocitos liberados por ratas testigo absoluto (TA), tratadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día del diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas en la mañana del estro (10:00 h).**

| Grupo                  | n  | TAO     | Número de ovocitos |
|------------------------|----|---------|--------------------|
| <b>Inyección en D2</b> |    |         |                    |
| TA                     | 10 | 10/10   | 7.8 ± 1.08         |
| VH                     | 10 | 9/10    | 10 ± 0.06          |
| TX                     | 9  | 3/9 a,b | 6.0 ± 2.64         |
| <b>Inyección en P</b>  |    |         |                    |
| TA                     | 10 | 10/10   | 7.8 ± 1.08         |
| VH                     | 10 | 9/10    | 9.3 ± 0.94         |
| TX                     | 8  | 8/10    | 11 ± 0.83          |

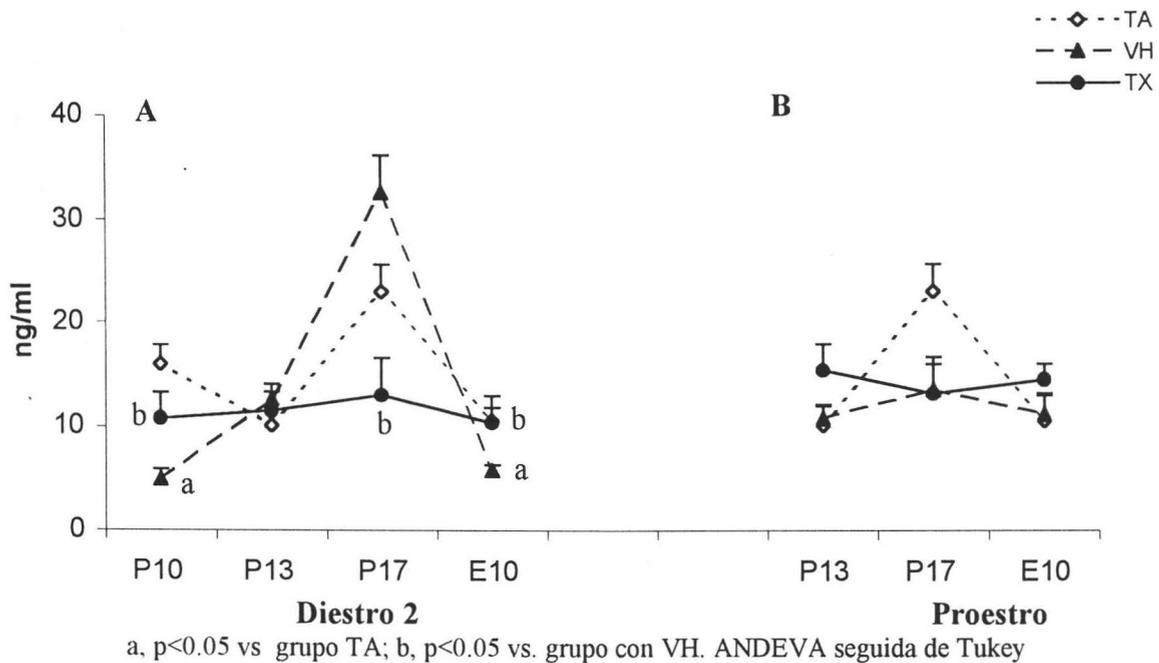
a, p < 0.05 vs. grupo TA; b, p < 0.05 vs. grupo con VH (prueba de Fisher)

### *Hormonas esteroides*

#### *Progesterona*

En el suero de los animales con inyección de VH en el día del diestro 2 y sacrificados a las 10:00 h del proestro o en el estro, la concentración de progesterona fue significativamente menor en comparación con el grupo TA. Este comportamiento se revirtió cuando los animales se sacrificaron a las 17:00 h del proestro (Figuras 8A y B).

En comparación con el grupo de animales que recibieron VH, la concentración de progesterona en suero de los animales que se inyectaron con TX en el día del diestro 2 y se sacrificaron a las 10:00 h del proestro, aumentó significativamente. En los animales sacrificados a las 17:00 h del proestro, la concentración de esta hormona disminuyó (Figura 8A). En los animales que se recibieron el TX en la mañana del proestro, la concentración de progesterona en suero fue similar a la del grupo con VH (Figura 8B).



**Figura 8. Concentración de progesterona en suero de ratas testigo absoluto (TA), inyectadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estro.**

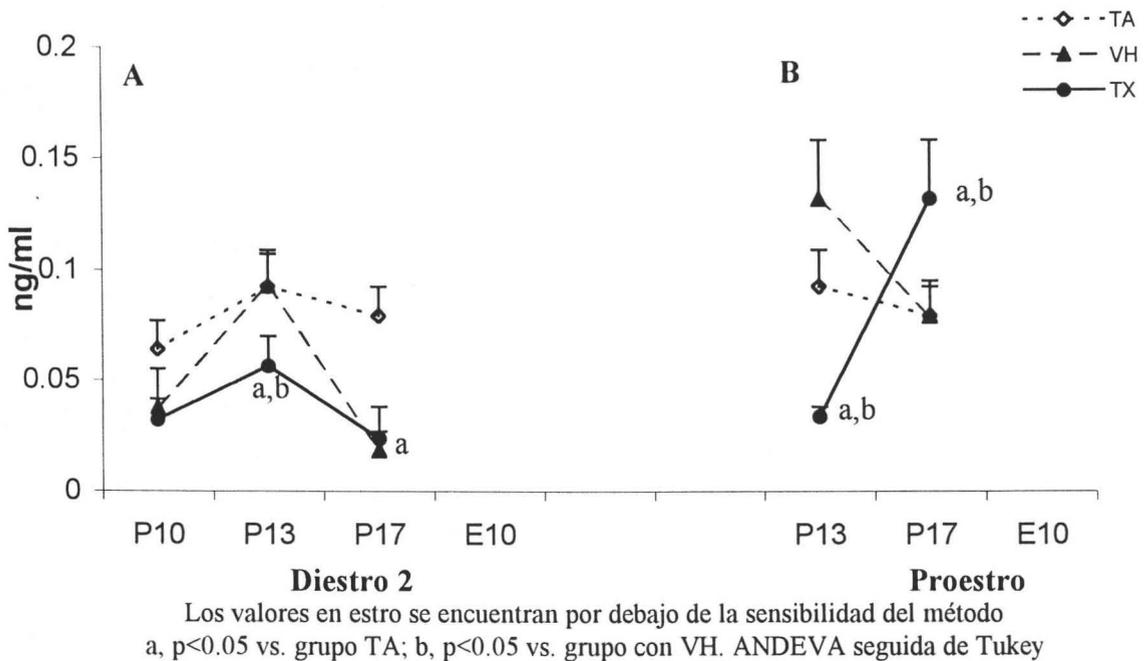
### *Testosterona*

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, la concentración de testosterona en suero fue menor en los animales que recibieron VH en el día del diestro 2 y se sacrificaron a las 17:00 h del proestro (Fig. 9A). En los animales con inyección de VH en la mañana del proestro no se observaron cambios significativos (Figura 9B).

La administración de TX en el diestro 2 resultó en una disminución en la concentración de testosterona en el suero de los animales sacrificados a las 13:00 h del proestro (Figura 9A).

En los animales que recibieron TX en la mañana del proestro y se sacrificaron a las 13:00 h del mismo día, la concentración de testosterona fue menor que en los que

recibieron VH o TA. Mientras que, la concentración de esta hormona aumentó cuando los animales se sacrificaron a las 17:00 h (Fig. 9B).

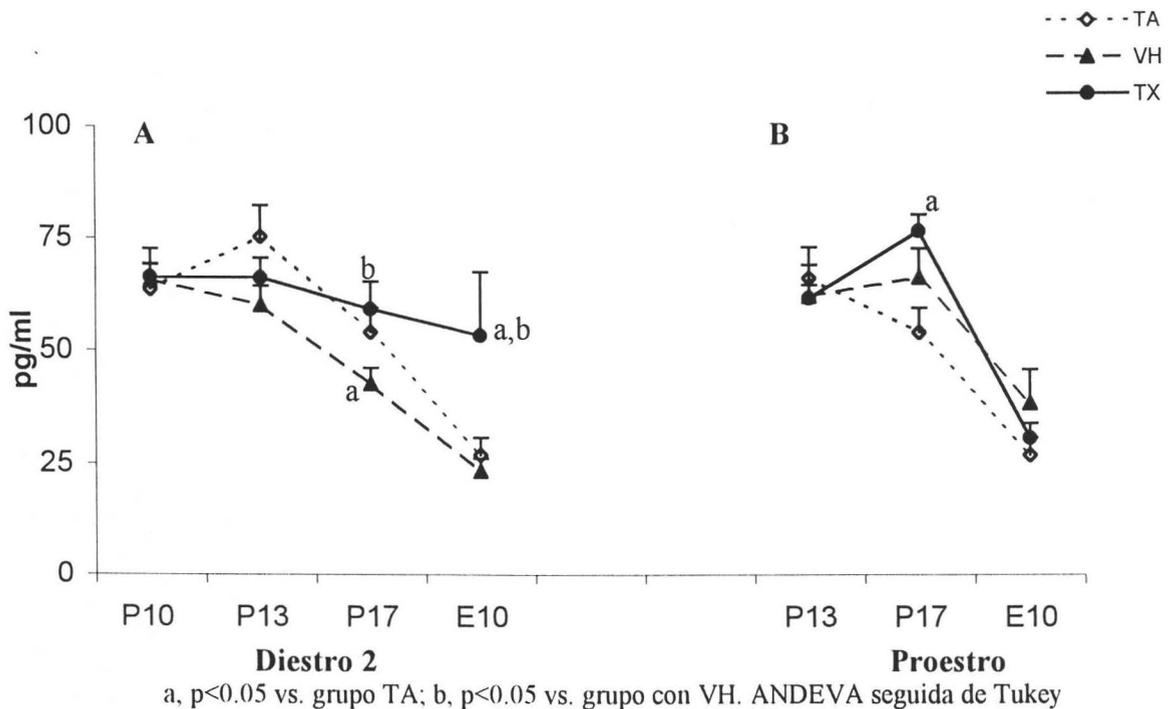


**Figura 9. Concentración de testosterona en suero de ratas testigo absoluto (TA), inyectadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estró.**

### *17 $\beta$ -estradiol*

En comparación con el grupo de animales TA, los animales que recibieron VH en la tarde de diestro 2 mostraron menor concentración de 17 $\beta$ -estradiol en suero cuando se sacrificaron a las 13:00 h o a las 17:00 h del proestro, diferencia que fue significativa únicamente a las 17:00 h; en el día del estró no se observaron cambios (Figura 10A). En los animales con inyección de VH en la mañana del proestro no se observaron cambios significativos (Figura 10B).

En los animales que se inyectaron con TX en la tarde del diestro 2 y se sacrificaron a las 17:00 h del proestro o a las 10:00 h del estro la concentración del 17 $\beta$ -estradiol fue mayor (Fig. 10A). En los grupos de animales que recibieron TX en la mañana del proestro, la concentración del 17 $\beta$ -estradiol en suero aumentó cuando los animales se sacrificaron a las 17:00 h del proestro (Fig. 10B).



**Figura 10.** Concentración de estradiol en suero de ratas testigo absoluto (TA), inyectadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estro.

### Gonadotropinas

#### FSH

En comparación con el grupo testigo absoluto, en los animales que recibieron VH en la tarde del diestro 2, la concentración de FSH se incrementó significativamente en los animales que se sacrificaron a las 10:00 h del proestro o estro (Figura 11A). La inyección

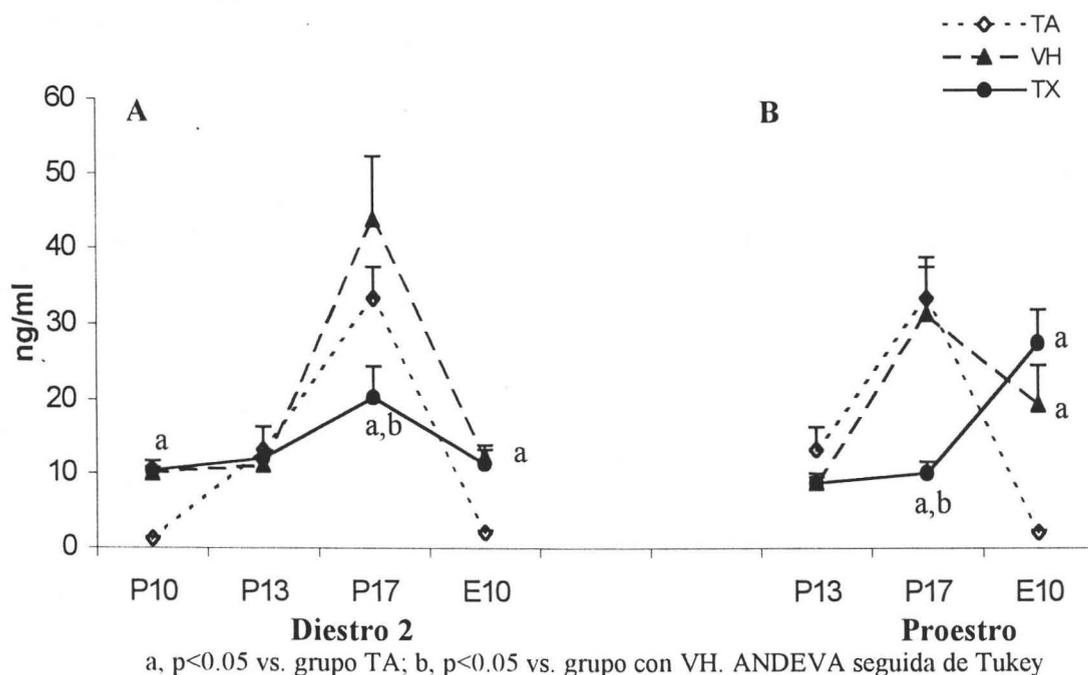
de VH en la mañana del proestro sólo alteró significativamente la concentración sérica de FSH en los animales sacrificados a las 10:00 h del estro, donde se observó una mayor concentración de esta hormona (Figura 11B).

La administración de TX en el diestro 2 o en el proestro resultó en la disminución de la concentración de FSH en suero cuando los animales se sacrificaron a las 17:00 h del proestro. Mientras que en los animales sacrificados a las 10:00 h del estro se revirtió este comportamiento (Figuras 11A y 11B).

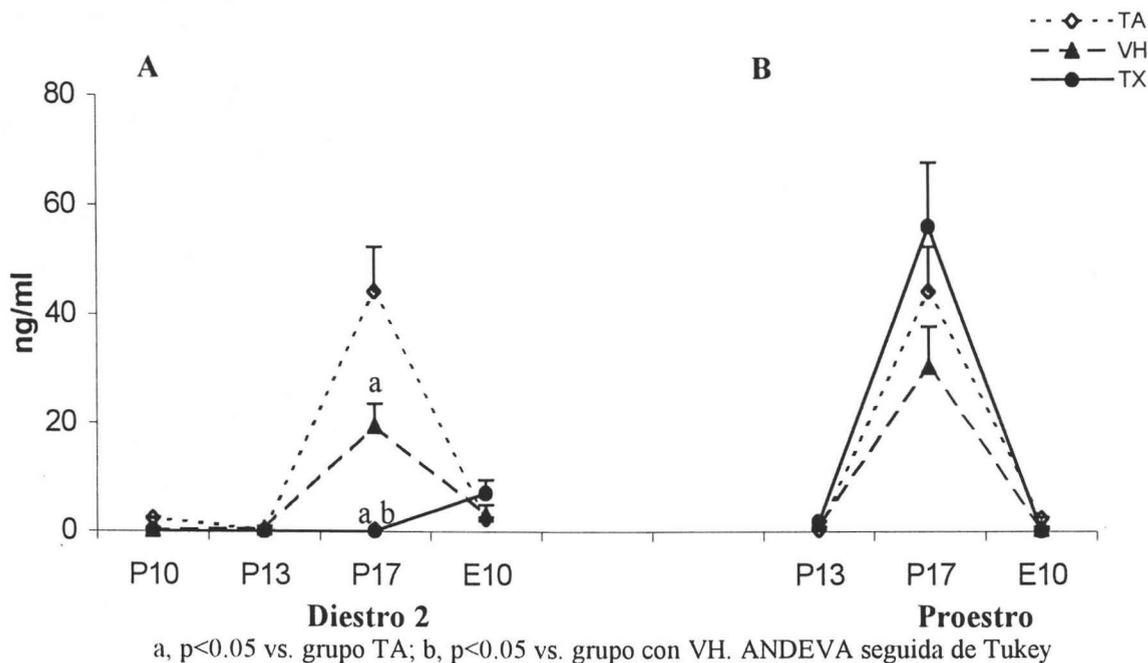
## ***LH***

La administración de VH en la tarde del diestro 2 resultó en la disminución significativa en la concentración de LH en el suero de los animales sacrificados a las 17:00 horas del proestro, en comparación con el grupo testigo absoluto (Fig. 12A). En los animales con inyección de VH en la mañana del proestro no se observaron cambios significativos (Figura 12B).

En comparación con el grupo con VH, en el grupo de animales con inyección de TX en diestro 2 y sacrificados a las 17:00 h del proestro, disminuyó la concentración en suero de la LH y no se observaron cambios cuando el TX se administró a las 09:00 h del proestro (Figuras 12A y B).



**Figura 11.** Concentración de FSH en suero de ratas testigo absoluto (TA), inyectadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estro.



**Figura 12.** Concentración de LH en suero de ratas testigo absoluto (TA), inyectadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estro.

### *Población folicular*

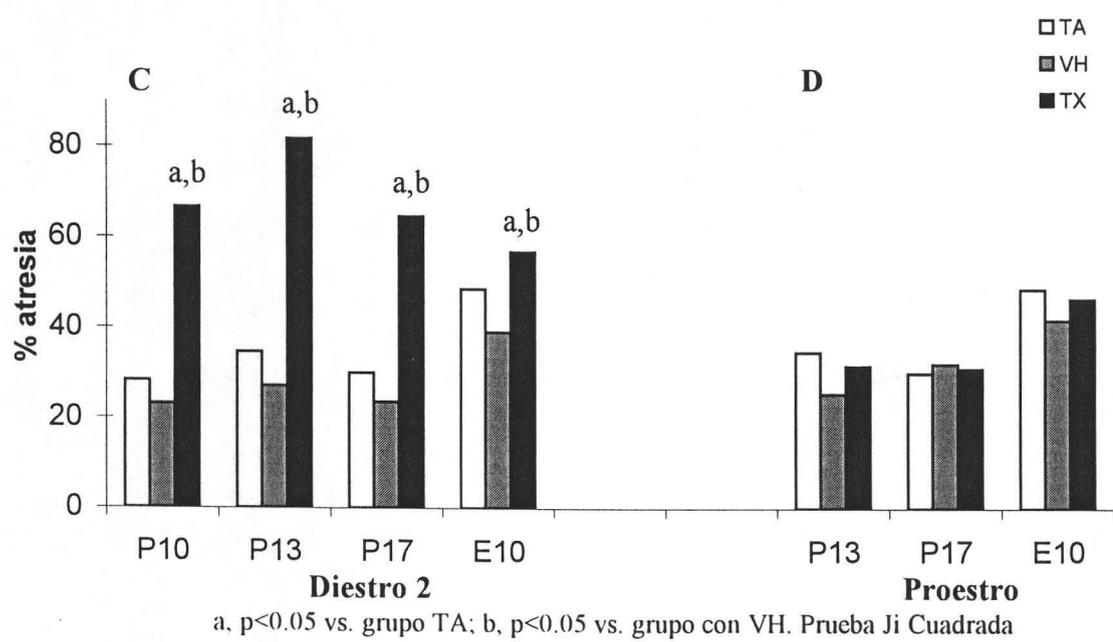
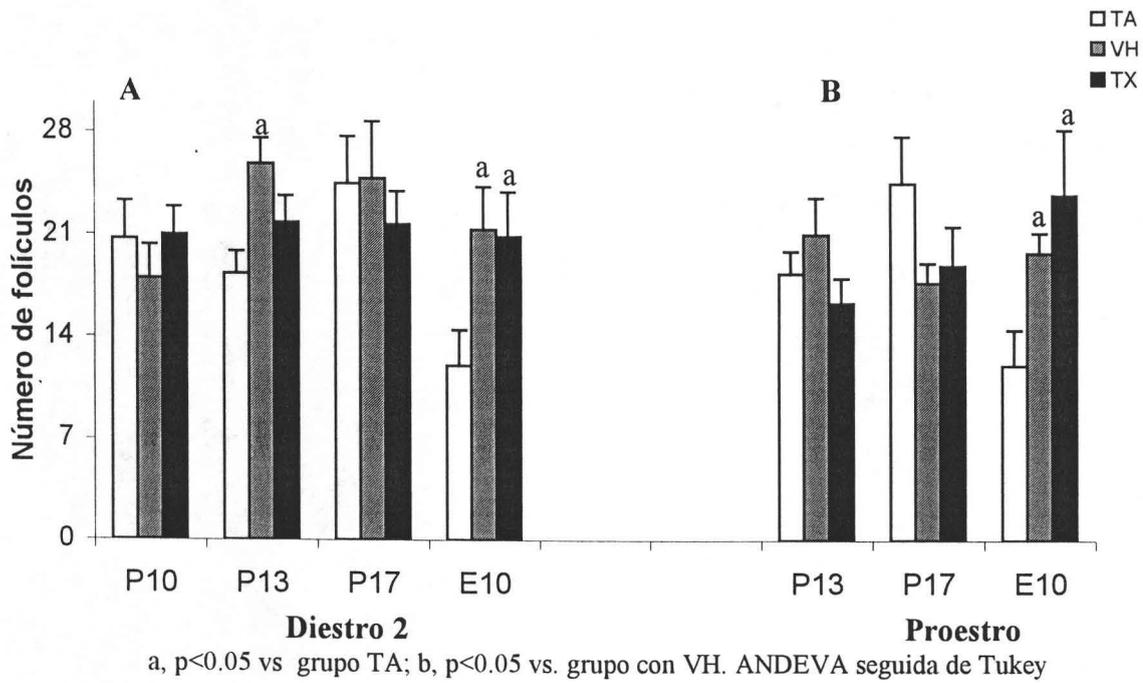
El número de total de folículos medidos en los ovarios de los animales inyectados con VH en el diestro 2 y sacrificados a las 13:00 h del proestro o a las 10:00 h del estro, aumentó de manera significativa en comparación al grupo de animales testigo absoluto (Fig. 13A). Este mismo comportamiento se observó cuando los animales recibieron el VH a las 09:00 del proestro y se sacrificaron a las 10:00 h del estro (Figura 13B).

La administración de TX a las 17:00 h del diestro 2 o a las 09:00 del proestro alteró significativamente el número de folículos medidos en los animales sacrificados a las 10:00 h del estro, donde se observó un mayor número (Figura 13B).

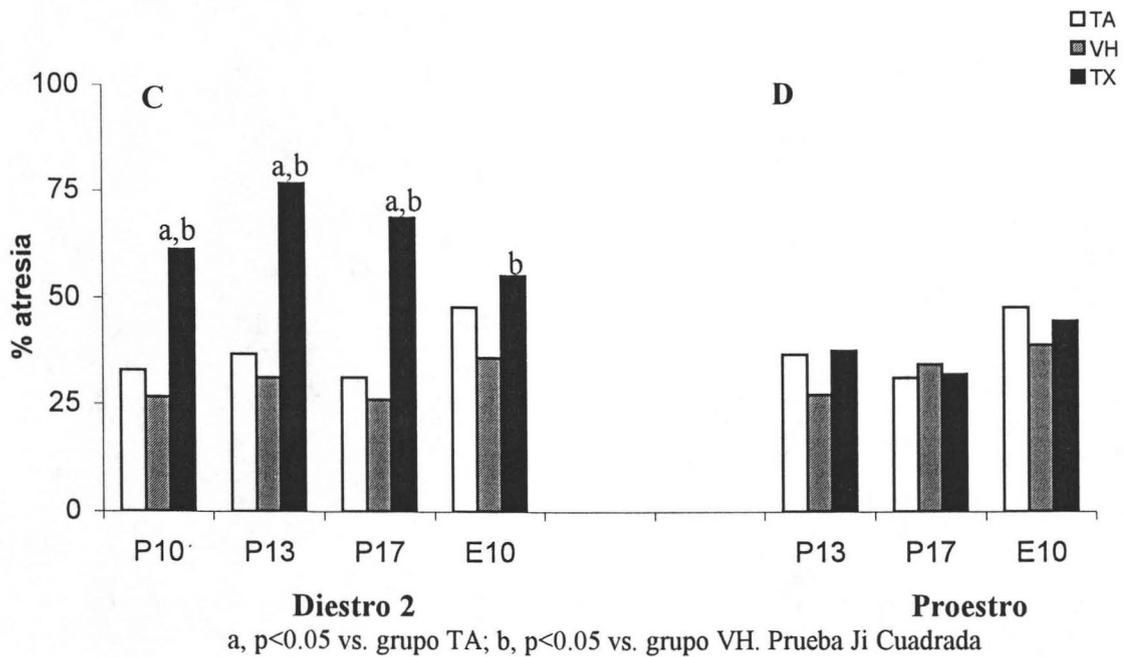
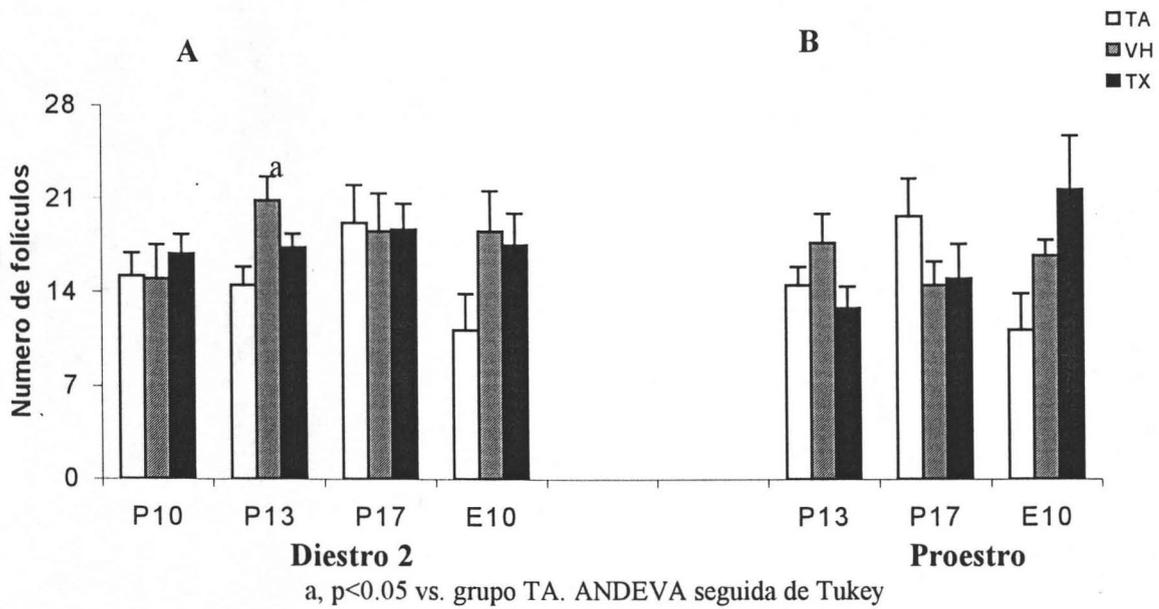
Al analizar el estado de los folículos se observó que en los animales que recibieron el VH a las 17:00 h del diestro 2 no se modificó el porcentaje de folículos atrésicos (Figura 13C). En cambio, la administración de TX en este mismo día resultó en el incremento de la incidencia de atresia (Fig. 13C), mientras que en los animales inyectados con el TX en el día del proestro, no se presentaron cambios significativos en ninguno de los grupos estudiados (Fig. 13D).

El número de folículos pequeños (<349  $\mu\text{m}$  de diámetro) medidos en los ovarios de los animales inyectados con VH en el diestro 2 y sacrificados a las 13:00 h del proestro, aumentó de manera significativa en comparación al grupo de animales testigo absoluto (Fig. 14A). En aquellos animales inyectados con VH en proestro no se modificó el número de folículos pequeños (Fig. 14B).

En los animales que recibieron VH en el día del diestro 2 y se sacrificaron en proestro no se observaron cambios en la incidencia de atresia en los folículos pequeños. En los animales inyectados con TX y sacrificados a diferentes horas del proestro o en el estro se incrementó el índice de atresia en este tipo de folículos (Fig. 14C). En los animales que recibieron VH o TX en el día del proestro, no se modificó la incidencia de atresia (Fig. 14D).



**Figura 13.** Número total de folículos medidos y porcentaje de folículos totales atrésicos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estro.



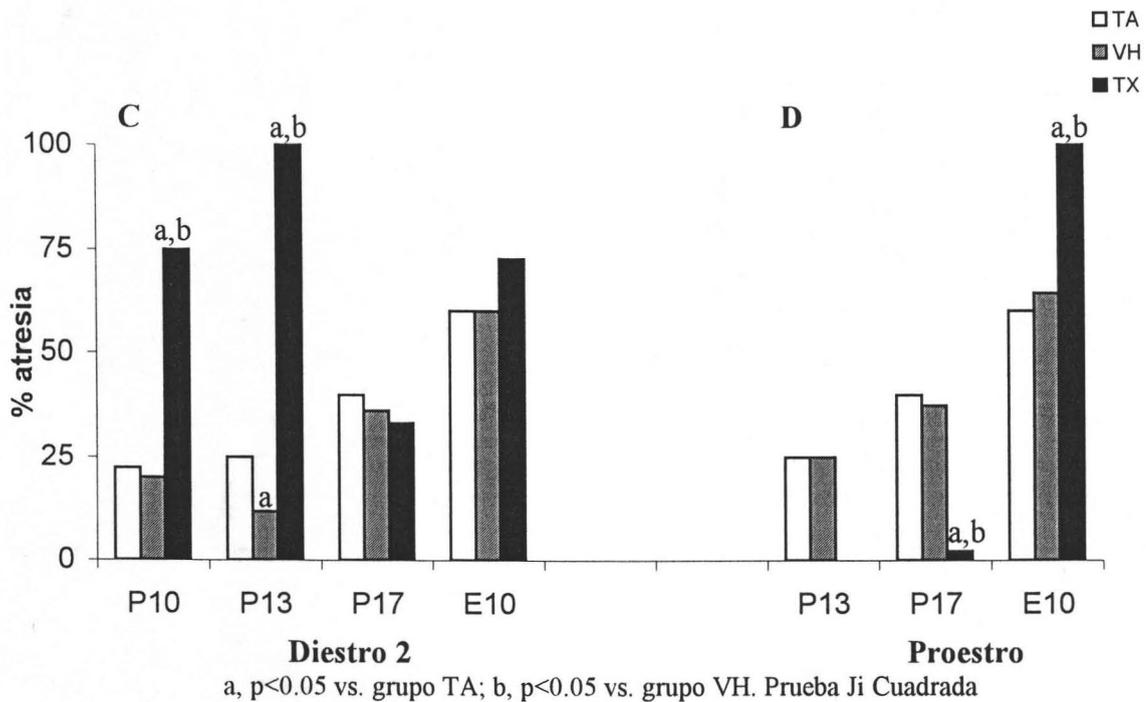
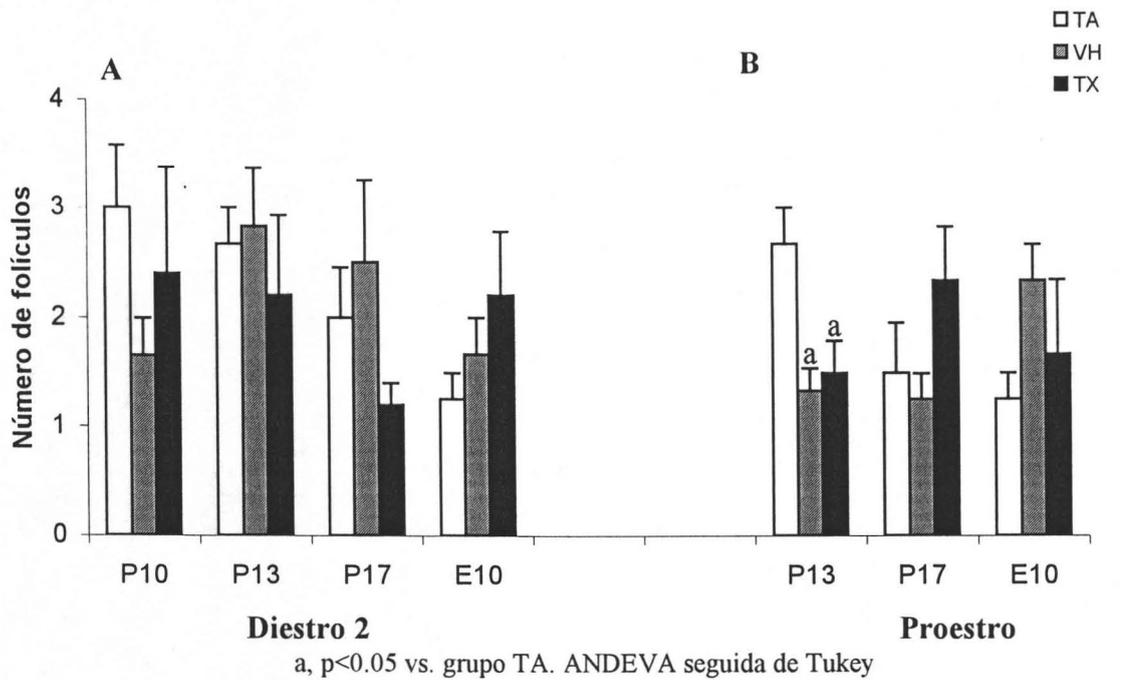
**Figura 14.** Número total de folículos pequeños (<math><349 \mu\text{m}</math>) y porcentaje de folículos atrésicos medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), tratadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifén (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estro.

En los grupos de animales que recibieron VH o TX a las 09:00 h del diestro 2, el número de folículos medianos (350-499  $\mu\text{m}$ ) no se modificó en ninguno de los horarios estudiados (Fig. 15A). Cuando el tratamiento se realizó en proestro, se observó que el número de este tipo de folículos disminuyó cuando los animales se sacrificaron a las 13:00 h del mismo día (Fig. 15B).

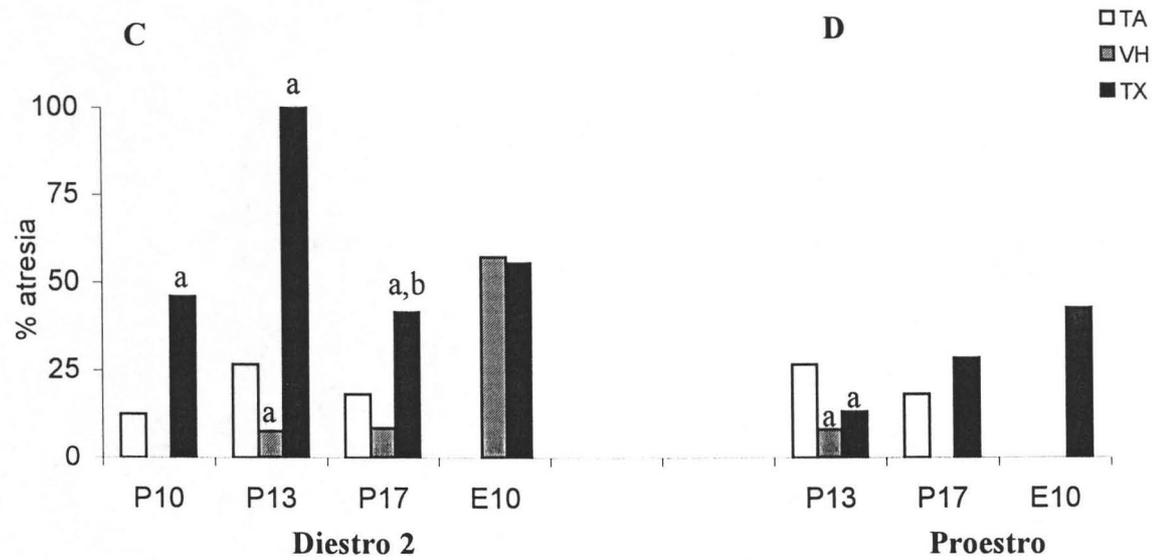
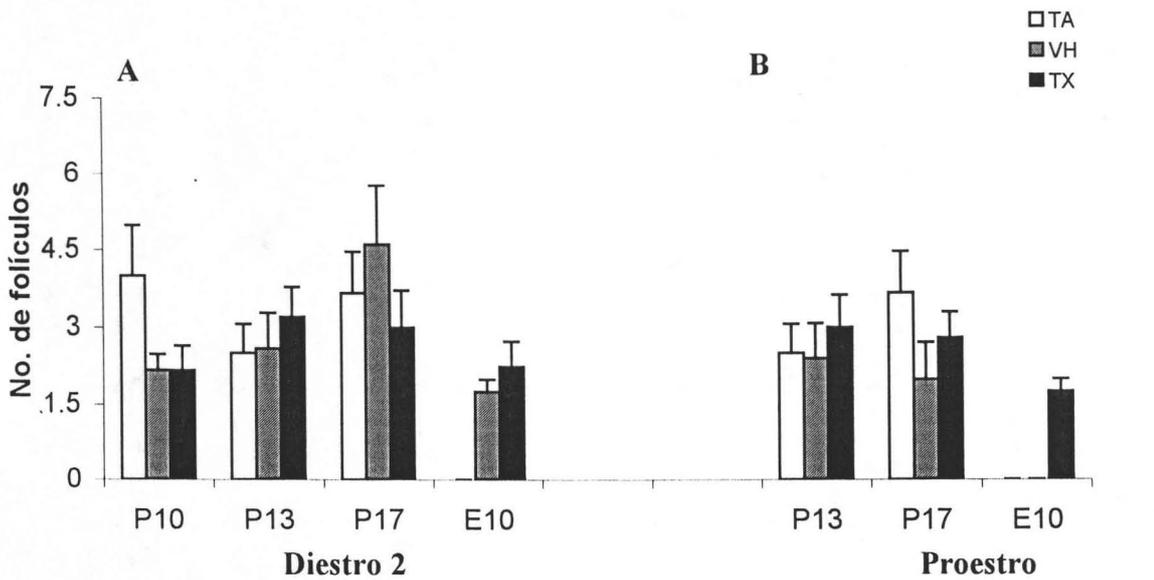
En los animales que recibieron VH en el día del diestro 2 y se sacrificaron a las 13:00 h del proestro la incidencia de atresia en los folículos medianos disminuyó de manera significativa y en los otros grupos no se observaron cambios (Fig. 15C). En los animales inyectados con TX en diestro 2 y sacrificados a las 10:00 o 13:00 h del proestro se incrementó el índice de atresia. En los animales tratados el día del proestro, la inyección de VH no modificó la incidencia de atresia en ninguno de los grupos estudiados. En cambio, la administración de TX provocó dos efectos significativos sobre los folículos medianos: una disminución en el porcentaje de atresia en los animales sacrificados a las 17:00 h del proestro y un aumento del mismo porcentaje en los animales sacrificados en la mañana del estro (Fig. 15D).

La administración de VH o TX en diestro 2 o proestro no alteró el número de folículos preovulatorios en ninguno de los grupos sacrificados en proestro. Sin embargo, en los ovarios de los animales testigo absoluto que fueron sacrificados en la mañana del estro no se observaron folículos preovulatorios; en tanto que la administración de VH o TX en diestro 2 ocasionó que sí se observaran este tipo de folículos en los animales tratados (Fig. 16A). En los animales tratados en proestro se presentó este mismo fenómeno pero sólo en los animales que recibieron TX (Fig. 16B).

La incidencia de atresia se incrementó en los folículos preovulatorios de los animales inyectados con TX en diestro 2 y sacrificados a las 10:00, 13:00 ó 17:00 h del proestro (Fig. 16C). Cuando la administración de TX o VH se realizó a las 09:00 h del proestro disminuyó el porcentaje de folículos atrésicos en los ovarios de los animales sacrificados a las 13:00 h del mismo día (Fig. 16D).



**Figura 15.** Número total de folículos medianos (350-499  $\mu\text{m}$ ) y porcentaje de folículos atrésicos (350-499  $\mu\text{m}$ ) medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), inyectadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estro.



a,  $p < 0.05$  vs. grupo TA; b,  $p < 0.05$  vs. grupo con VH. Prueba Ji Cuadrada

**Figura 16.** Número total de folículos preovulatorios ( $>500 \mu\text{m}$ ) y porcentaje de folículos atrésicos preovulatorios medidos en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA), inyectadas con aceite de maíz (VH) o con tamoxifen (TX) a las 17:00 h del día de diestro 2 o a las 09:00 h del día del proestro y sacrificadas a diferentes horas del proestro o a las 10:00 h del estro.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio permiten sugerir que el bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos en el día del diestro 2 induce modificaciones en la secreción de las gonadotropinas y en el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico y como consecuencia de ello en la ovulación. Así mismo muestran que los efectos del bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos dependen del día del ciclo estral en que se realice el bloqueo.

El tamoxifen es un bloqueador de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos e impide que se manifiesten los efectos biológicos de los estrógenos en sus órganos blanco como el eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Kim y col. 2002). Con base en estas evidencias y los resultados obtenidos en el presente estudio, es posible apoyar la idea de que la unión de los estrógenos con sus receptores se constituye como un factor esencial en la modulación de la actividad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y que tiene como resultado la ovulación espontánea, como ya ha sido planteado previamente (Brown, 1994; Shivers y col., 1983; Skinner y col., 1999).

Las diferencias en la ovulación observadas en los animales que recibieron el tamoxifen en el diestro 2 o en el proestro, nos permite pensar que los efectos del bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos dependen del día del ciclo en que se realice. Según Schwartz y col. (2000), el incremento en la concentración del estradiol que es esencial para que se presente la secreción preovulatoria de la GnRH y de las gonadotropinas, se inicia en la tarde del diestro 2. Con base en esta evidencia es posible pensar que al administrar el tamoxifen en este día del ciclo estral, se impidió la acción de los estrógenos en los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación. Mientras que cuando el tratamiento se realizó en la mañana del proestro, el tiempo en el que actuaron los estrógenos en el eje hipotálamo-hipófisis fue suficiente para que se desencadenara la secreción de las gonadotropinas y como consecuencia se llevara a cabo la ovulación.

En la rata adulta, en la tarde del proestro se produce la liberación masiva de las gonadotropinas (secreción preovulatoria) que induce la ovulación (Schwartz, 2000). En el presente estudio, la falta de ovulación observada en los animales que recibieron tamoxifen en la tarde del diestro 2, posiblemente es el resultado de la modificación en la secreción preovulatoria de las gonadotropinas. La disminución en la concentración de FSH y LH observada en estos animales, apoya esta interpretación y coincide con lo reportado previamente por Gao y col. (2002) quienes mostraron que la administración de este fármaco en la rata adulta, disminuye la secreción de las gonadotropinas e inhibe la ovulación.

Se ha reportado que el  $17\beta$ -estradiol interviene en la regulación de la secreción de la GnRH (Nathwani y col. 2000) y que este esteroide modula la expresión del número de los receptores a GnRH en los gonadotropos (Robertson y Blamey 2003) y por esta vía, también ejerce un control sobre la liberación de las gonadotropinas (Bellido y col., 2003; Gregg y col., 1990; McArdle y col., 1992). Por ello, es posible pensar que la inhibición de la secreción preovulatoria de la FSH y LH observada en los animales inyectados con tamoxifen en el diestro 2 sea el resultado de los procesos antes mencionados.

Otro factor que posiblemente influyó en la inhibición de la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, es la disminución en la concentración progesterona en suero observada en los animales que recibieron tamoxifen en la tarde del diestro 2 y fueron sacrificados en la tarde del proestro. Esto probablemente se debe a la ausencia del estímulo que ejercen las gonadotropinas sobre la síntesis de progesterona. La idea de que la disminución en la concentración de progesterona es un factor que explica la anovulación en estos animales es apoyada por los resultados de Donath y Nishino (1998) y Peluso y Gruenberg (1983) quienes mostraron que la progesterona también juega un papel esencial en el proceso de ovulación, ya que al extraer y cultivar ovarios de ratas maduras, con las concentraciones adecuadas de FSH, LH,  $17\beta$ -estradiol y progesterona, no se presentan alteraciones significativas en el desarrollo de los folículos preovulatorios y la ovulación, cuando se compara con animales intactos.

En la rata, el desarrollo del folículo tiene una duración de 17 a 19 días (Greenwald y Roy, 1994; Domínguez y col., 1991). Esto explicaría por qué en los ovarios de los animales que recibieron tamoxifen en la tarde de diestro 2 y se sacrificaron en proestro no se modificó el número de folículos pequeños (<349  $\mu\text{m}$  de diámetro), medianos (350-499  $\mu\text{m}$ ) y preovulatorios (>500  $\mu\text{m}$ ). Es posible que en estos animales el desarrollo folicular continuó de manera normal, debido a la acción de las gonadotropinas de ciclos anteriores, o a las concentraciones basales de estas hormonas del mismo ciclo del tratamiento. La importancia de las concentraciones basales de gonadotropinas en el mantenimiento del desarrollo folicular se ha mostrado tanto en la etapa del desarrollo prepuberal de la rata (Uilenbroek y col., 1976; Uilenbroek y Wolf-Exalto, 1979) como en la etapa adulta (De Reviers, 1974).

El aumento del índice de atresia en los folículos pequeños medianos y preovulatorios de los animales que fueron tratados con tamoxifen en diestro 2 y sacrificados en proestro, posiblemente es el resultado de que el bloqueo de los receptores a estógenos en el ovario impidió que los estrógenos promovieran la mitosis, la actividad sintética de las células de la granulosa y como consecuencia el desarrollo folicular (Schwartz, 2000; Fitzpatrick y col., 1999). Otro factor posiblemente involucrado es la inhibición de la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, ya que existen evidencias de que la hipofisectomía en la rata adulta se traduce en atresia folicular, lo cual es revertido por la administración de FSH (Edwards y col., 1977; De Reviers, 1974).

Los andrógenos se consideran inductores de atresia folicular. El tratamiento de ratas con andrógenos, como la testosterona o la dihidrotestosterona (DHT) o con gonadotropina coriónica humana (hCG) que estimula la producción endógena de andrógenos, promueve la atresia de los folículos ováricos (Bagnell y col., 1982). No obstante, en este estudio se observó que el incremento en la incidencia de atresia en los animales inyectados con tamoxifen en diestro 2 no se acompañó de un incremento en la concentración sérica de testosterona. Por ello, es posible considerar que la inhibición de la actividad estrogénica es el factor fundamental responsable del incremento de la incidencia de atresia en los animales tratados en el diestro 2.

El bloqueo de los receptores a estrógenos en la mañana del proestro no modificó la ovulación, ni el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico. Este hecho probablemente se debe a que los animales estuvieron expuestos a los cambios normales de la concentración de estradiol durante la tarde y noche del diestro 2, así como las primeras horas del proestro. Por ello, es posible sugerir que el bloqueo de los receptores a estrógenos a las 09:00 h del proestro ya no modificó el estímulo de los estrógenos que comenzó el día anterior (Schwartz, 2000).

Gao y col. (2000) observaron que la administración de tamoxifen en ratas prepúberes induce un incremento en la concentración de  $17\beta$ -estradiol en el día de la ovulación esperada. Este reporte concuerda con los resultados de este estudio cuando la administración de tamoxifen se realizó en el diestro 2, ya que en los animales sacrificados a las 10:00 h del estro se observó un incremento en la concentración sérica de  $17\beta$ -estradiol. En relación a esto, es posible que a pesar que independientemente de que disminuyera la concentración de la FSH, la cantidad presente, fue suficiente para mantener activado el complejo  $P_{450}$ -aromatasa, responsable de la transformación de andrógenos a estrógenos en las células de la granulosa (Gore-Langton y col., 1994; Hinshelwood, 1999).

Es posible que la inhibición de la actividad estrogénica también sea responsable de la reducción de la masa ovárica observada en los animales inyectados en diestro 2 y sacrificados en estro, ya que estudios previos como el de Takeyoshi y col. (2002) han mostrado que el bloqueo de la síntesis gonadal de estrógenos se traduce en una disminución del peso de ovarios y de útero. Al respecto, Dierschke y col. (1983) reportaron que la administración unilateral a nivel ovárico de estrógenos incrementa el peso del ovario tratado. A lo anterior debe adicionarse lo reportado por Ickenstein y Bandiera (2002) que coincide con los resultados del presente estudio, ya que estos autores reportaron que la administración del tamoxifen en ratas adultas disminuye el peso de ovarios y también de útero.

En conjunto, los resultados de este estudio permiten sugerir que los efectos del bloqueo de los receptores a estrógenos ( $\alpha$  y  $\beta$ ) sobre la concentración de progesterona,

testosterona, 17- $\beta$ -estradiol, gonadotropinas y sobre el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico dependen de la etapa del ciclo estral en que se realice el tratamiento.

## CONCLUSIONES

- ❖ En la rata adulta, el bloqueo de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  de los estrógenos en la tarde del diestro 2, inhibe la secreción preovulatoria de gonadotropinas, así como también altera el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico y como resultado de ello se inhibe la ovulación espontánea.
- ❖ El bloqueo de los receptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) de los estrógenos en la mañana del proestro no tiene efecto sobre la ovulación espontánea de la rata adulta.
- ❖ Los efectos de la administración de tamoxifen sobre la ovulación espontánea, secreción de gonadotropinas y crecimiento y diferenciación del folículo ovárico dependen de la etapa del ciclo estral en que se realice el tratamiento.

## Bibliografía

- ❖ **Allen E. y E.A. Doisy** (1924). The induction of a sexually mature condition in immature females by injection of the ovarian follicle hormone. **Am. J. Physiology**; **69**: 577-588.
- ❖ **Arimura, A.** (2000). Hypothalamic hormones. En: **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. Conn, M. y M. Freeman (eds.). Humana Press. U.S.A. , 59-85.
- ❖ **Arteaga-López, P.R., R. Domínguez, M.A. Cerbón, C.A. Mendoza-Rodríguez y M.E. Cruz** (2003). Differential mRNA expresión of alpha and beta estrogen receptor isoforms and GnRH in the left and right side of the preoptic and anterior hypothalamic area during the estrous cycle of the rat. **Endocrine**; **21(3)**, 251-260.
- ❖ **Bagnell, C.A., T.M. Mills, A. Costoff y V.B. Mahesh.** (1982). A model for the study of androgen effects on follicular atresia and ovulation. **Biol Reprod**; **27**, 903-914.
- ❖ **Bellido, C., J. Martín de las Mulas, M. Tena-Sempere, R. Aguilar, R. Alonso, J.E. Sánchez Criado** (2003). Tamoxifen induces gonadotropin-releasing hormone self-priming through an estrogen-dependent progesterone receptor expression in the gonadotrope of the rat. **Neuroendocrinology**; **77(6)**, 425-435.
- ❖ **Bendell, J.J. y J.H. Dorrington.** (1990). Epidermal growth factor influences growth and differentiation of granulosa cells. **Endocrinology**; **127**, 533-540.
- ❖ **Billard, R. y P.G. McDonald.** (1973). Inhibition of ovulation in the rat by intrahypothalamic implants of antiestrogen. **J Endocrinol**; **56**, 585-562.
- ❖ **Bishop, W., C.P. Fawcett, L. Krulich y S.M. McCann.** (1972). The effects of hypothalamic lesions on the release of gonadotropins and prolactin in response to estrogen and progesterone treatment in female rats. **Endocrinology**; **91**, 1404-1425.
- ❖ **Brown, R.** (1994). **An introduction to neuroendocrinology**. Cambridge University Press. Great Britain. pp. 1-145.

- ❖ **Butler, J.A., M. Sjorberg y C.W. Cohen.** (1999) Evidence for oestrogen receptor alpha-immunoreactivity in gonadotropin-releasing hormone-expressing neurones. **J Neuroendocrinol**; **11**, 331-335.
- ❖ **Carson, R.S., J.K. Findlay e I.J. Clarke.** (1981). Estradiol, testosterone and androstenedione in follicular fluid during growth and atresia of ovarian follicle. **Biol Reprod**; **24**, 105-113.
- ❖ **Charli, J., G. Ponce y J. Bravo.**(1991). Los mecanismos de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En: **Tópicos selectos de biología de la reproducción**. R. Domínguez (ed.). U.N.A.M.-Porrúa. México, 59-85.
- ❖ **Clark, J.H. y K.M. Sahilaja.** (1994). Actions of ovarian steroid hormones. En: **The physiology of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (eds.). Raven Press U.S.A. 1011-1059.
- ❖ **Corner G.W. y W.M. Allen** (1929). Physiology of the corpus luteum. **Am. J. Physiology**; **90**: 329-330.
- ❖ **Cover, P.O. y J.C. Buckingham** (1989). Effect of estradiol and tamoxifen on GnRH self-priming in perfused rat adenohipophysial cells. **Acta Endocrinol (Copenh.)**; **121(3)**, 365-373.
- ❖ **Counis, R.** (1999). Gonadotropin biosynthesis. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. D. Neill (eds.) Academic Press. U.S.A. **2**, 507.
- ❖ **Cruz, M.E., G. Villegas, A. Domínguez-González, R. Chavira, R. Domínguez.** (2001). Ovulation delay induced by blockade of the colinergic system on dioestrus-1, is related to changes in dopaminergic activity of the preóptica anterior-hipotalamic area of the rat. **Brain Res Bull**; **54 (4)**, 339-344.
- ❖ **Curtis, H. y N.S. Barnes** (2000). **Biología**. 6ª. Edición. Editorial Médica Panamericana. España. p 1314.
- ❖ **De Reviere, M.M.** (1974). Etude quantitative de l'action des hormones gonadotropes hypophysaires sur la population folliculaire de l'ovaire de ratte immature : signification biologique du dosage de l'hormone folliculo-stimulante par la test de Steelman et Pohley (Dissertation). L'Université de Tours.
- ❖ **Dierschke, D.J., A. Nimrod y N. Dekel.** (1983). ATD (1,4,6-androstatrien-3, 17-dione) reduces number of ovulations in immature rats by a direct action on

folliculogenesis. En: **Factors regulating ovarian function**. G. S. Greenwlad y P. F. Terranova (eds.). Raven press. U. S. A., 29-32.

- ❖ **Dissen, G, C. Romero, A.N. Hirshfield y S. Ojeda** (2001). Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. **Endocrinology**; **142 (5)**, 2078-2086.
- ❖ **Döcke, F. y G. Dörner**. (1965). The mechanism of the induction of ovulation by oestrogens. **J Endocrinol**; **33**, 491-510.
- ❖ **Domínguez, R., R. Chávez y M.E. Cruz**. (1991). La regulación del crecimiento y desarrollo del folículo ovárico. En: **Tópicos selectos de biología de la reproducción**. Domínguez (ed.). U.N.A.M.-Porrúa. México, 163-188.
- ❖ **Donath, J. y Y. Nishino** (1998). Effects of partial versus pure antiestrogens on ovulation and the pituitary-ovarian axis in the rat. **J steroid biochem mol boil**; **66(4)**, 247.
- ❖ **Dorrington, J.H., A.V. Chuma y J.J. Bendell**. (1988). Transforming growth factor  $\beta$  and follicle stimulating hormone promote rat granulosa cell proliferation. **Endocrinology**; **123**,353-359.
- ❖ **Edwards, R.G. , R.E. Fowler, R.E. Gore-Langton**. (1977). Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. **J Reprod Fertil**; **51**, 237-263.
- ❖ **Everett, J.W.** (1948). Progesterone and estrogen in the experimental control of ovulation time and other features of the estrous cycle in the rat. **Endocrinology**; **43**: 389-405.
- ❖ **Ferin, M.** (1999). Ovarian cycle, mammals. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. D. Neill (eds.) Academic Press. U.S.A.; **3**, 547-552.
- ❖ **Fink, G.**(1988). Gonadotropin secretion and its control. En: **The physiology of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (eds.). Raven Press U.S.A. 1349-1378.
- ❖ **Fink, G.** (2000). Neuroendocrine regulation of pituitary function. En: **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. M. Conn y M. Freeman (eds). Humana Press. U.S.A., 135-145.
- ❖ **Fitzpatrick, S., J. Funkhouser, D. Sindoni, P. Stevis, D. Deecher, A. Bapat, I. Merchenthaler, D. Frail** (1999). Expression of estrogen receptor- $\beta$  protein in rodent ovary. **Endocrinology**; **140(6)**, 2581.

- ❖ **Flerkó, B.** (1974). Hypothalamic mediation of neuroendocrine regulation of hypophysial gonadotrophic functions. En: **MTP International Review of science, Reproductive Physiology, Physiology**; R.O. Greep (ed). Butterworths-University Park Press. U.S.A.; **8**, 1-32.
- ❖ **Freeman M.E.** (1994). The neuroendocrine control of the ovarian cycle on the rat. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil, J.D. Neill (eds.). Raven Press, New York, pp. 613-658
- ❖ **Gao, X., BK Petroff, O. Oluola, G. Georg, PF Terranova, KK Rozman.**(2002). Endocrine disruption by indole-3-carbinol and tamoxifen: blockage of ovulation. **Toxicol Appl Pharmacol**; **183 (3)**, 179-188.
- ❖ **Geneser, F.** (1999). **Histología**. 3ª edición. Editorial Médica Panamericana. Argentina; pp. 614-638.
- ❖ **Gill-Sharma M.K., N. Balanisor, P. Parte, M. Aleem, H.S. Juneja.** (2001). Effects of tamoxifen metabolites on fertility of male rat. **Contraception**; **62(2)**, 103-109.
- ❖ **González, D, C. Bellido, R. Aguilar, J.C. Garrido-García, G. Hernández, R. Alonso, J.E. Sánchez-Criado.** (2000). Luteinizing hormone secretion elicited in a ligand-independent activation of progesterone receptor manner at pituitary level in the rat: differential effect of two selective estrogen receptor modulators. **Neurosci. Lett**; **289(2)**, 111-114.
- ❖ **González, F.** (1999). Adrenarche. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. D. Neill (eds.) Academic Press. U.S.A.; **1**, 55-61.
- ❖ **Gore-Langton, R.E. y D.T. Armstrong** (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: **The physiology of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (eds.). Raven Press U.S.A., 571-627.
- ❖ **Greenwald, G. y S. Roy.** (1994). Follicular development and its control. En: **The physiology of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (eds.). Raven Press U.S.A., 629-721.
- ❖ **Gregg, D.W., M.C. Allen y T.M. Nett.** (1990). Estradiol-induced increase in number of gonadotropin-releasing hormone receptors in cultured ovine pituitary cells. **Biol Reprod**; **43(6)**, 1032-1036.

- ❖ **Halasz, B.** (2000). The hypothalamus as an endocrine organ. En: **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. M. Conn y M. Freeman (eds.). Humana Press. U.S.A. ,3-21.
- ❖ **Hillarp, N. A.** (1949). Studies on the localization of hypothalamic centers controlling the gonadotrophic function of the hypophysis. **Acta Endocrinol**; **2**, 11-20.
- ❖ **Hillensjo, T., C. Eckholm y L. Hedin.** (1983). Local regulation of steroidogenesis in the preovulatory rat follicle. En: **Factors regulating ovarian function**. G. S. Greenwlad y P. F. Terranova (eds.). Raven press. U. S. A., 33-37.
- ❖ **Hinshelwood, M.** (1999). Steroidogenesis, overview. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. D. Neill (eds.) Academic Press. U.S.A. **4**, 644-653.
- ❖ **Hirshfield, A.** (1991). Development of follicle in the mammalian ovary. **Int. Rev. Cytol.**; **124**, 43-101.
- ❖ **Hirshfield, A.** (1997). Overview of ovarian follicular development: considerations for the toxicologist. **Environmental and molecular mutagenesis**; **29**, 10-15.
- ❖ **Hrabovsky, E., A. Steinhauser, K. Barabás, P. Shughrue, S. Petersen, I. Merchenthaler, Z. Liposits.** (2000). Estrogen receptor  $\beta$  immunoreactivity in luteinizing hormone-releasing hormone neurons of the rat brain. **Endocrinology**; **142(7)**,3261.
- ❖ **Ickenstein, L. y S. Bandiera.** (2002). Persistent suppression of hepatic CYP2A1 expression and serum triiodothyronine levels by tamoxifen in intact female rats: dose-response análisis and comparison with 4-hydroxitamoxifen, fulvestrant (ICI 182, 780), and 17-beta-benzoate. **Journal of Pharmacol Exp Ther**; **302(2)**,584.
- ❖ **Jennes, L., W.C. Beckman, W.E. Stumpf y R. Grzanna.** (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenalinergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. **Experimental Brain Research**; **46**, 331-338.
- ❖ **Kang S.K., K.C. Choi, C.J. Tai, N. Auersperg y P.C. Leung.** (2001). Estradiol regulates gonadotropin releasing hormone (GnRH) and its receptor gene expression and antagonizes the growth inhibitory effects of GnRH in human ovarian surface epithelial and ovarian cancer cells. **Endocrinology**; **142(2)**, 580-588.0

- ❖ **Ketani, M., S. Ketani, C. Kaloglu y B. Guney.** (2002). Effects of tamoxifen administration in rat vaginas: an ultrastructural and light microscopy study. **Eur J Gynaecol Oncol**; **23 (6)**,557.
- ❖ **Kilen, S.M. y N.B. Schwartz.** (1999). Estrous cycle. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. D. Neill (eds.) Academic Press. U.S.A. **2**, 127-136.
- ❖ **Kim, H.S., J.H. Shin, H.J. Moon, T.S. Kim, I.H. Kang, J.H. Seok, I.Y. Kim, K.L. Park y S.Y. Han.** (2002). Evaluation of the 20-day pubertal female assay in sprague-dawley rats treated with DES, tamoxifen, testosterone and flutamide. **Toxicological Sciences**; **67**:52-62.
- ❖ **Kordon, C., S. Drovos, E. Martínez y R. Weiner.** (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: **The physiology of reproduction**. E. Knobil y J. Neill (eds.). Raven Press U.S.A. 1621-1681.
- ❖ **Krause, W., HM Hubner y U Wichman.** (1985). Tratment of ologospermia by tamoxifen: no evidence for direct testicular action. **Andrologia**; **17(3)**, 285-290.
- ❖ **Leeson, R., T. Leeson y A. Paparo.** (1990). **Histología**. Ed. Interamericana. México, pp. 416-443.
- ❖ **Lindzey, J. y K.S. Korach.** (1999). Estrogen action on the female reproductive tract. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. D. Neill (eds.) Academic Press. U.S.A. **2**, 79-86.
- ❖ **Lunenfeld, B., Z. Kraiem y A. Eshkol.** (1975). The function of the growing follicle. **J Reprod Fertil**; **45**, 567-564.
- ❖ **Malven, P.** (2000). Neurotransmitters as regulators of the hypothalamyc function. En: **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. M. Conn y M. Freeman (eds.). Humana Press. U.S.A., 59-73.
- ❖ **Mannaerts, B., J. Uilenbroek, P. Schot y R. de Leeuw.** (1994). Folliculogenesis in hypophysectomized rats after treatment with recombinant human follicle-stimulating hormone. **Biology of reproduction**; **51**, 72-81.
- ❖ **McArdle C.A., E. Schomerus, I. Groner, A. Poch.** (1992). Estradiol regulates gonadotropin-releasing hormone receptor number, growth and inositol phosphate production in alpha T3-1 cells. **Mol Cell Endocrinol**; **87(1-3)**, 95-103.

- ❖ **McDonnell, D.P.** (1999). Antiestrogens. En: : **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobil y J. D. Neill (eds.) Academic Press. U.S.A. 1, 229-239.
- ❖ **Monroy, J., M.E. Ayala, R. Chavira, P. Damián-Matsumura y R. Domínguez.** (2003). Comparative effects of injecting 5,6-dihydroxytryptamine in the dorsal or medial raphe nuclei on rat puberty. **Brain Research Bulletin**; **60**, 307-315.
- ❖ **Montes, G. y E. Luque.** (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. **Acta anatómica**; **133**, 192-199.
- ❖ **Müller, E.E. y G. Nistico.** (1989). **Brain messengers and the pituitary**. Academic Press. U.S.A.
- ❖ **Nathwani, P.S., S.K. Kang, K.W. Cheng, K.C. Choi y P.C. Leung.** (2000). Regulation of gonadotropin-releasing hormone and its receptor gene expression by 17beta-estradiol in cultured human granulose-luteal cells. **Endocrinology**; **141(5)**, 1754-1763.
- ❖ **Oury, F., C. Faucher, I. Rives, M. Bensaid, G. Bouche, J.M. Darbon.** (1992). Regulation of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate-dependent protein kinase activity and regulatory subunit RII $\beta$  content by basic fibroblast growth factor (bFGF) during granulosa cell differentiation: possible implication of protein kinase C in bFGF action. **Biol Reprod**; **47**, 202-212.
- ❖ **Palkovits, M.** (2000). Micro and microscopic structure, innervation and vasculature of the hypothalamus. En: **Neuroendocrinology in physiology and medicine**. M. Conn y M. Freeman (eds.). Humana Press. U.S.A., 23-40.
- ❖ **Parte P.P., N. Balanisor, M.K. Gill-Sharma y H.S. Juneja** (2000) Effect of 5alpha-dihydrotestosterone implants on the fertility of male rats treated with tamoxifen. **J Androl**; **21(4)**, 525-533.
- ❖ **Patisaul, H.B., E.A. Aultman, I.F. Bielsky, L.J. Young, M.E. Wilson.** (2003). Immediate and residual effects of tamoxifen and ethynylestradiol in the female rat hypothalamus. **Brain Res**; **978(1-2)**, 185-193.
- ❖ **Peluso, J. J. y M. L. Gruenberg.** (1983). *In vitro* follicular development and ovulation within ovaries exposed to hormone levels wich mimic those of the rat estrous cycle. En: **Factors regulating ovarian function**. G. S. Greenwlad y P. F. Terranova (eds.) Raven Press. U.S.A., 22-37.

- ❖ **Peters, H., A.G. Byskov, M. Faber.** (1973). Intraovarian regulation of follicle growth in the immature mouse. En: **The development and maturation of the ovary and its functions.** Peters, H. (ed). Excerpta Medica. Amsterdam, 20-23.
- ❖ **Piacsek, B.E. y J. Meites.** (1966). Effects of castration and gonadal hormones on hypothalamic content of luteinizing hormone releasing factor. **Endocrinology; 79,** 432.
- ❖ **Pinilla, L., L.C. González, F. Gaytán, M. Tena-Sempere y E. Aguilar.** (2001). Oestrogenic effects of neonatal administration of raloxifene on hypothalamic-pituitary-gonadal axis in male and female rats. **Reproduction; 121(6),**915.
- ❖ **Prevot, V, D. Croix, C.M. Rialas, P. Poulain, G.L. Fricchione, G.B. Stefano, J.C. Beauvillain.** (1999). Estradiol coupling to endothelial nitric oxide stimulates gonadotropin-releasing hormone release from rat median eminence via membrane receptor. **Endocrinology; 142(2),** 652-659.
- ❖ **Robertson, J.F. y R.W. Blamey.** (2003). The use of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) agonists in early and advanced breast cancer in pre- and perimenopausal women. **Eur J Cancer; 39(7),** 861-869.
- ❖ **Ross, M., L. Romrell, G. Kaye.** (1997). **Histología.** 3<sup>a</sup>. edición. Editorial Médica Panamericana. México, pp. 674-710.
- ❖ **Roth, C., M. Schricker, M. Lakomek, A. Strege, I. Heiden, H. Luft, U. Munzel, W. Wuttke y H. Jarry.** (2001). Autoregulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system during puberty: effects of antagonistic versus agonistic GnRH analogs in female rat model. **Journal of endocrinology; 169,** 361-367.
- ❖ **Sánchez-Criado, J.E., P. Guelmes, C. Bellido, M. González, G. Hernández, R. Aguilar, J.C. Garrido-Gracia, A.R. Bello, R. Alonso.** (2002). Tamoxifen but no other selective estrogen receptor modulators antagonizes estrogen actions on luteinizing hormone secretion while inducing gonadotropin-releasing hormone self-priming in the rat. **Neuroendocrinology; 76(4),** 203-213.
- ❖ **Schwartz, N.** (2000). Neuroendocrine regulation of reproductive cyclicity. En: **Neuroendocrinology in physiology and medicine.** M. Conn y M. Freeman (eds.). Humana Press. U.S.A., 135-145.

- ❖ **Shivers, B. D., R. E. Harlan J. L. Morrell y D. W, Pfaff.** (1983). Absence of estradiol concentration in cell nuclei of LHRH-immunoreactive neurons. **Nature; 304**, 345-347.
- ❖ **Shughrue, N., B. Komm e I. Merchenthaler.** (1996). The distribution of estrogen receptor- $\beta$  mRNA in the rat hypothalamus. **Steroids; 61**,678.
- ❖ **Silverman, A., I. Livne y J. Witky.** (1994). The gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunochemistry and in situ hybridization. En: **The rat nervous system.** G. Paxinos (ed.). Academic Press. U.S.A.,1683-1710.
- ❖ **Simpkins, J.W., W.J. Millard, S.M. Gabriel y E.E. Soltis.** (1985). Noradrenergic methods in neuroendocrinology. En: **Handbook of pharmacological methodologies for the study of the neuroendocrine system.** R.W. Steger y A. Johns (eds.). CRC Press. U.S.A., 1-63.
- ❖ **Skyenner M.J., Sim J.A., y Herbinson A.E.** (1999). Detection of oestrogen receptor anpha and beta messeger ribonuclei acids in adult gonadotropin-releasing hormone neurons. **Endocrinology; 140.** 5195-5201.
- ❖ **Smith, C.L.** (1999). Estrogens, overview. En: **Encyclopedia of reproduction.** E. Knobil y J. D. Neill (eds.) Academic Press. U.S.A. **2**, 119-126.
- ❖ **Smith M.J. y L. Jennes** (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. **Reproduction; 122**, 1-10.
- ❖ **Steger, R.W. y W. Morgan.** (1985). Dopaminergic control of pituitary hormone release. En: **Handbook of pharmacological methodologies for the study of the neuroendocrine system.** R.W. Steger y A. Johns (eds.). CRC Press. U.S.A, 65-108.
- ❖ **Takeyoshi, M., M. Sawaki, S. Noda, T. Muroi, K. Yamasaki.** (2002). Effect of gonaotropin-relesing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats. **Reprod Toxicol; 16(4)**, 637-369.
- ❖ **Tarantal, A.F., A.G. Hendrickx, S.A. Matlin, B.L. Lasley, Q.Q. Gu, C.A. Thomas, P.M. Vince; P.F. Van Look.** (1993). Tamoxifen as an antifertility agent in the long-tailed macaque (*Macaca fascicularis*).**Contraception 47(3)**,307-316.
- ❖ **Teerds, K. S. y J.H. Dorrington.** (1993) Immunohistochemical localization of  $3\beta$ -hydroxisteroid dehydrogenase in the rat ovary during follicular development and atresia. **Biology of reproduction; 49**, 989-996.

- ❖ **Uilenbroeck J.TH.J., A. Wolff-Exalto y Blankenstein (1976).** Serum gonadotrophins and follicular development in immature rats after early androgen administration. **Journal of Endocrinology**; **68**, 461-468.
- ❖ **Uilenbroeck J.TH.J., A. Wolff-Exalto (1979)** Prepuberal follicular development and ovarian activity in adulthood after suppression of gonadotropin levels in immature female rats. **Biology of reproduction**; **20**, 384-389.
- ❖ **Ulloa-Aguirre, A. (1991).** Aspectos bioquímicos funcionales de la hormona estimulante del folículo. En: **Tópicos selectos de biología de la reproducción**. R. Domínguez (ed.) U.N.A.M.-Porrúa. México. 83-103.
- ❖ **Van Voorhis, B.J. (1999).** Follicular development. En : **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobill y J. Neill (eds.). Academic Press. U.S.A., **2**, 376-389.
- ❖ **Veldhuis, X. (1999).** El eje hipotálamo-hipofisario-gonadal masculino. En: **Endocrinología de la reproducción**. 4ª. Edición. S. Yen, R. Jaffé y R. Barbieri (eds.) Ed. Médica panamericana. Argentina, pp. 664-67
- ❖ **Ville C.A., E.P. Solomon, C.E. Martín, D.W. Martín, L.R. Berg y P.W. Davis. (1992).** **Biología**. 2ª edición. Nueva editorial interamericana. México. pp. 1089-1090.
- ❖ **Williams, B., A.N. Brooks, T.C. Aldridge, W.D. Pennie, R. Stephenson, C.A. McArdle. (2000).** Oestradiol is a potent mitogen and modulator of GnRH signaling in alpha T3-1 cells: are these effects causally related?. **J Endocrinol**; **164(1)**, 31-43.
- ❖ **Wilson, M.E. y R.J. Handa. (1998).** Direct actions of gonadal steroid hormones on FSH secretion and expression in the infantile female rat. **J Steroid. Biochem. Mol. Biol.**; **66(1-2)**, 71-78.
- ❖ **Wilson, S. y F. Cunningham.(1981).** Effects of an anti-oestrogen, tamoxifen (ICI 45, 474), on luteinizing hormone release and ovulation in the hen. **Journal of endocrinology**; **88(2)**,309.
- ❖ **Yao, H.H.C. y J.M. Bahr. (1999).** Ovary, overview. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobill y J. Neill (eds.). Academic Press. U.S.A.; **3**, 590-597.
- ❖ **Yen, S. (1999).** Neuroendocrinología de la reproducción. En: **Endocrinología de la reproducción**. 4ª. Edición. S. Yen, R. Jaffé y R. Barbieri (eds.) Ed. Médica Panamericana. Argentina, pp. 31-84.

- ❖ **Yoshinaga, K.** (1999). Regulation of estrogen secretion. En: **Encyclopedia of reproduction**. E. Knobill y J. Neill (eds.). Academic Press. U.S.A.; **2**, 108-118.
- ❖ **Zhou, W., N. Koldzic-Zivanovic, C.H. Clarke, R. de Beun, K. Wasserman, P.S. Bury, K.A. Cunningham y M.I. Thomas.**(2002). Selective estrogen receptor modulator effects in the rat brain. **Neuroendocrinology**; **75(1)**, 24-33.