

29
2 ej.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

ESTUDIO DE LA PERDIDA DE LA FUNCION REPRODUCTIVA EN LA RATA HEMBRA. POSIBLE PARTICIPACION DEL SISTEMA CATECOLAMINERGICO EN LA DISMINUCION DE LA RESPUESTA OVARICA A LAS GONADOTROPINAS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

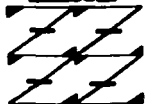
B I O L O G O

P R E S E N T A :

FRANCISCO GABRIEL VAZQUEZ CUEVAS

DIRECTORA DE TESIS: DRA. REBECA CHAVEZ GENARO

VENA DE
TES
ZARAGOZA



LO FORMAN LAS
DE SU LUZ Y REFLEJOS

MEXICO, D. F.

1997

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIO SUPERIORES ZARAGOZA

Estudio de la pérdida de la función reproductiva en la rata hembra. Posible participación del sistema catecolaminérgico en la disminución de la respuesta ovárica a las gonadotropinas.

Tesis presentada por : Francisco Gabriel Vázquez Cuevas

Directora de tesis : Dra. Rebeca Chávez Genaro

Esta tesis fue realizada en el laboratorio de Fisiología Reproductiva de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES Zaragoza, UNAM.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo de la DGAPA proyecto IN203095 y PUIS, UNAM.

*Para mi mamá Beatriz Cuevas Santiago que me ha
enseñado a caminar por la vida*

A mi familia, especialmente a mi tía Rosa por su fortaleza

A Miriam

A mis amigos

Agradecimientos

A la Dra. Rebeca Chávez Genaro por su paciencia, esfuerzo y amistad.

A la Dra. Leticia Morales Ledesma por su inapreciable ayuda.

A la Dra. Patricia Rosas Saucedo por su confianza y sus aportaciones.

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá como reconocimiento a su esfuerzo para consolidar este grupo.

A los miembros del jurado :

M.en B.E. Enrique Mendieta

M en C Raúl Zavala Chavero

por sus valiosas aportaciones

A la Biol. Carolina Morán Raya

A la Biol. Juana Monroy Moreno

Al Biol. Alejandro Domínguez González

Por su ayuda

Al laboratorio de hormonas esteroideas del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y al Biol. Roberto Chavira por su asesoramiento en la realización del RIA.

A todos mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

*" Ciertamente - me dije - , ciertamente
algo sucede en la reja de mi ventana.
Dejad, pues, que vea lo que sucede allí ,
y así penetrar pueda en el misterio.
Dejad que a mi corazón llegue un momento el silencio,
y así penetrar pueda en el misterio."
¡ Es el viento, y nada más !*

The Raven

*Edgar Allan Poe
(1809-1849)*

INDICE

Introducción	1
Perfiles hormonales en la rata vieja.....	1
El ovario.....	4
Hipotálamo-hipófisis.....	6
La participación de la inervación simpática en el control de la ovulación.....	8
Planteamiento del problema	12
Hipótesis	13
Objetivo	14
Metas	14
Materiales y método	15
Resultados	20
Caracterización de la ciclicidad, ovulación, concentración plasmática de estradiol y progesterona y concentración tisular de monoaminas hipotalámicas en ratas hembras viejas de la cepa CII-ZV.....	20
Respuesta ovulatoria al remplazo hormonal con gonadotropinas en la rata vieja intacta o con desnervación catecolaminérgica inducida por la administración de guanetidina.....	30
Discusión	45
Conclusiones	53
Bibliografía	54
Apéndice	60
Cuantificación de monoaminas por HPLC.....	60
Cuantificación de estradiol y progesterona por RIA.....	67

RESUMEN

Se ha propuesto que adicional al control ejercido por las hormonas, la información que transcurre por los nervios ováricos modula la secreción de esteroides, la respuesta ovárica a las gonadotropinas (Kawakami y col., 1981) y los mecanismos de selección de aquellos folículos que van a llegar a ovular en respuesta al pico preovulatorio de LH (Burden, 1985). Así mismo, se ha mostrado que la modulación que esta inervación ejerce es diferente en la etapa puberal y en la adulta (Lara y col., 1990; Flores y col., 1990).

En la rata vieja la concentración de noradrenalina ovárica es mayor que en la rata cíclica, por lo que en este estudio se planteó estudiar el papel de la inervación catecolaminérgica en el proceso de pérdida de la función reproductiva.

Dado que la rata vieja de la cepa CII-ZV no estaba caracterizada fue necesario describir los eventos de pérdida cíclicidad y de la ovulación espontánea, concentración y actividad monoaminérgica en el área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) y en el hipotálamo medio basal (HMB) y la concentración de 17β -estradiol y progesterona plasmática para obtener el modelo de estudio, que nos permitiera analizar la participación de la inervación simpática en el control de la función ovárica.

De esta caracterización se decidió trabajar con la rata vieja que presenta estro vaginal persistente a las edades de 12 y 18 meses de edad, utilizando ratas jóvenes cíclicas como control. Se analizó el efecto de la desnervación por la inyección de guanetidina en una dosis de 20 mg/kg de peso durante 8 días sobre la respuesta ovárica ante el estímulo hormonal de gonadotropinas. Los resultados obtenidos muestran que en la rata joven cíclica la desnervación provocó disminución en la proporción de animales ovulantes (6/11 vs 14/14, $p < 0.05$) y en el número de ovocitos liberados (5.18 ± 1.60 vs 11.23 ± 0.54 , $p < 0.05$). El estímulo con PMSG-hCG provocó superovulación (21.3 ± 1.63 vs 5.18 ± 1.60 , $p < 0.05$).

En la rata en estro vaginal persistente, de 12 meses de edad, ya no se presentó ovulación espontánea y las concentraciones plasmáticas de estradiol fueron elevadas y constantes. En estos animales el estímulo gonadotrópico indujo la ovulación en 5 de 13 animales con una cuota ovulatoria de 2.4 ± 1.3 ovocitos. En la hembra desnervada a los 12 meses de edad, el estímulo hormonal provocó la ovulación en 6 de 13 animales los que ovularon 5.5 ± 1.22 ovocitos.

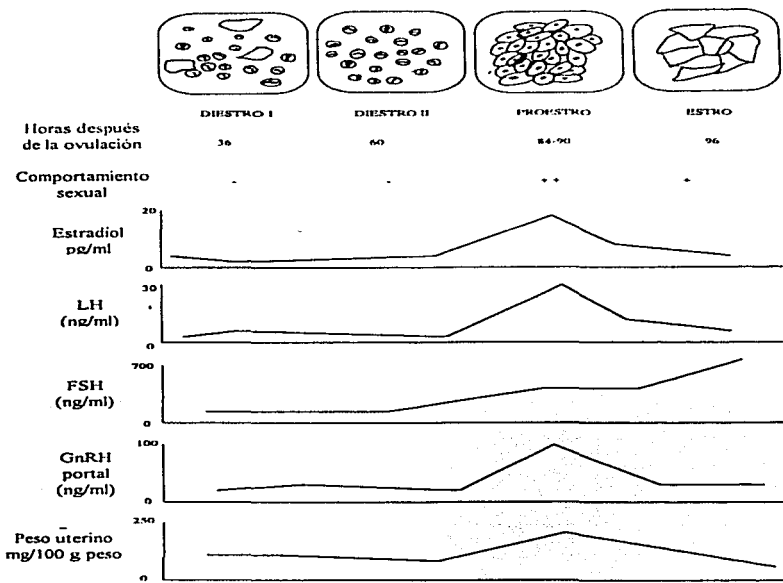
Los resultados presentados en este trabajo, muestran que la inervación catecolaminérgica modula los procesos neuroendócrinos que conllevan a la senescencia reproductiva.

INTRODUCCIÓN

Perfiles hormonales en la rata vieja

En las hembras de los mamíferos, la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, está caracterizada por la presencia de ciclos (Feder, 1981). En la rata, los ciclos se denominan estrales, tienen una duración de 4 ó 5 días y pueden ser analizados a partir de la toma diaria del frotis vaginal. El ciclo estral puede ser dividido en dos días de diestro, caracterizados por la presencia de leucocitos, uno de proestro en el que se observan células epiteliales nucleadas y un estro distinguido por la presencia de células epiteliales anucleadas. La caracterización citológica de cada una de estas fases, es un reflejo de los cambios neuroendócrinos del individuo.

El epitelio vaginal exhibe cambios citológicos en respuesta a los estrógenos y la progesterona (Montes y Luque, 1988). Así, la concentración de estradiol en plasma comienza a incrementarse en el día de diestro II, alcanza su concentración máxima en la mañana del proestro. Los estrógenos son responsables de la distensión del útero y de la presencia de los picos preovulatorios de gonadotropinas: la hormona luteinizante (LH), la hormona estimulante del folículo (FSH) y la prolactina (PRL). Al mismo tiempo se observa una elevación de la concentración plasmática de progesterona, que disminuye en el estro temprano. En el día del estro el folículo preovulatorio se rompe para liberar al ovocito y (Feder, 1981) y comienza el proceso de luteinización, constituyendo así los cuerpos lúteos que se encargan de secretar progesterona y 20 α -dihidro-progesterona (Short, 1982). Después de que se ha producido la ovulación, los estrógenos, la LH, la FSH y la PRL se mantienen en concentraciones basales (Esquema 1).



Esquema 1. Citología vaginal (diestro 1, diestro 2, proestro y estro), receptividad sexual, concentraciones plasmáticas de estradiol, hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y variación del peso del útero durante el ciclo estral (Tomado de Feder, 1981).

Esta condición de ciclicidad se presenta a lo largo de la vida fértil del individuo, y se pierde a medida que el animal envejece. En el caso de la rata y otros roedores como el ratón; el primer estado de aciclicidad senescente se caracteriza por la presencia de estro vaginal persistente (EVP), el epitelio vaginal se observa cornificado y existe receptividad sexual constante, manifestaciones que indican altas concentraciones plasmáticas de estrógenos y bajas de progesterona. Además se observa disminución en la frecuencia de la ovulación y en consecuencia disminuye la fertilidad.

En la rata vieja en la que aún se presenta la ovulación, se observa que los estrógenos plasmáticos aumentan y la progesterona disminuye, así mismo se presentan concentraciones elevadas de testosterona y de androstenediona (Nass y col., 1984). La disminución en la secreción de progesterona durante el envejecimiento puede contribuir al alargamiento del ciclo estral, esto se ve apoyado por el hecho de que en las ratas viejas el implante subcutáneo de progesterona retarda la pérdida del ciclo estral (vom Saal y col., 1994).

Antes de perder la ciclicidad, el pico preovulatorio de LH es de menor magnitud y se retarda de dos a tres horas con respecto al de un animal joven (Lu, 1983); esta reducción en la magnitud del pico de LH también se observa cuando éste es inducido por la administración de estradiol en ratas y ratones ovariectomizados a diferentes edades (Lu y col., 1981). Estos resultados permiten sugerir que las concentraciones elevadas de estradiol en las ratas con cornificación vaginal persistente, provocan una disminución en la sensibilidad hipotalámica e hipofisiaria a los estrógenos (retroalimentación positiva) (Blake

y col., 1983; Lu y Kledzikgs, 1981; Matt y col., 1993), aunque no afecta la retroalimentación negativa (Matt y col., 1993).

Los estudios en cuanto a la secreción de FSH son controversiales, ya que mientras algunos autores muestran que no existen diferencias en las concentraciones plasmáticas de esta hormona conforme avanza la edad (De Paolo y Chappel, 1986), otros indican que la disminución de la hormona en el plasma después del pico preovulatorio es más lenta en los animales de mayor edad en comparación con lo que ocurre en adultas jóvenes (Nass y col., 1984). Ya que las concentraciones de FSH son reguladas por la inhibina tanto como por el estradiol, no sería sorprendente pensar que existan cambios de éstos a medida que el animal envejece, afectando además la dinámica folicular.

Al presentarse la pérdida total de la función reproductora, la citología vaginal muestra anestro persistente (los frotis vaginales exhiben solamente leucocitos) y las concentraciones de estradiol y progesterona en plasma han disminuido hasta ser similares a los de un animal castrado (Gee y col., 1983; Lu y col. 1979). Por lo tanto, los eventos que desencadenan el proceso de envejecimiento reproductivo pueden estar asociados con cambios fisiológicos en el ovario y/o en el sistema nervioso central (SNC).

El ovario

En el ovario de los mamíferos, el número de ovocitos está predeterminado por la especie; durante la vida embrionaria o en la postnatal temprana ya cuenta con los óvulos que dispondrá durante la etapa reproductiva. La mayoría de ellos están destinados a degenerar, proceso al que se le denomina atresia folicular

(Adams, 1982), y se estima que alrededor de un 50% de ellos se pierde antes de la pubertad.

En la etapa adulta, el número de folículos ováricos en crecimiento (preantrales) disminuye con la edad, mientras el número de folículos de Graff, de ovocitos liberados por ovulación y de cuerpos lúteos permanece normal hasta el final de la vida fértil. En el animal viejo en el que ya no se presenta la ovulación espontánea se observa que el crecimiento folicular es limitado, con altos índices de atresia hasta que los ovocitos se terminan (Butcher y Page, 1981).

Algunos estudios sugieren que la disminución de folículos ováricos pudiera ser la principal causa que desencadena la pérdida de la función reproductora. Se ha mostrado que el trasplante de ovarios de ratonas jóvenes a viejas restablece la ciclicidad (Krohn, 1962). Se ha reportado que existen varios métodos que pueden alterar la tasa de pérdida folicular, entre ellos se encuentra la radiación con rayos X, la hipofisectomía y la hemicastración. Al parecer la duración de la vida reproductiva es controlada en gran parte por el ritmo con que disminuyen los ovocitos en el ovario (Butcher y Page, 1981).

La rata posee una importante reserva de ovocitos hasta el momento en que desaparece la ciclicidad (entre 1500 y 3000 ovocitos), no así para el ratón de la cepa C57BL/6J que al momento de presentar la aciclicidad conserva alrededor de 100 folículos (Nelson y Felicio, 1985). Así mismo, en los roedores y principalmente en los ratones existe gran variabilidad en la relación aciclicidad-número de folículos, ya que algunas cepas cesan el ciclo con 500 folículos y otras siguen cíclicas y ovulando con solamente 100 folículos (vom Saal, 1994).

El decremento en el número de folículos en crecimiento y por tanto de folículos atrésicos resulta en una disminución del tamaño del tejido intersticial del ovario durante el envejecimiento; lo cual puede afectar la cantidad y el tipo de esteroides secretados por el ovario y repercutir en la funcionalidad del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Butcher y Page, 1981, Novak, 1970). En las hembras del ratón el número de cuerpos lúteos en ratonas permanece constante conforme avanza la edad, sin embargo degeneran en menor tiempo de lo que ocurre en animales jóvenes (Harman y Talbert, 1970); por otro lado en la rata vieja se ha mostrado que no existe alteración de la función luteal (Miller y Riegle, 1980; Butcher y Page, 1981).

Por otra parte, se ha descrito que conforme avanza la edad del animal se presenta disminución en la respuesta del ovario estimulado con gonadotropinas evaluada como el aumento de peso y el número de ovocitos ovulados (Collins y col. 1980). Sin embargo Erickson y col. (1979) encuentran que el número de receptores a LH en las células de la granulosa de folículos de Graff no varía entre ratas viejas en estro persistente y ratas jóvenes en el día del proestro y tampoco lo hace la capacidad de estos folículos para aromatizar androstenediona a estrógenos.

Hipotálamo- hipófisis

El proceso de envejecimiento en el sistema nerviosos central (SNC) se caracteriza por una serie de cambios estructurales y funcionales entre los que se observan hipertrofia neuronal, disminución del número de neuronas, hiperactividad glial y supersensibilización de los receptores (Finch, 1993).

En el humano se ha descrito disminución del número de neuronas hipotalámicas y cambios morfológicos (disminuye el número de arborescencias dendríticas) asociados con la edad (Kushima y col., 1961); en el ratón senescente no se ha descrito la pérdida de neuronas GnRHérgicas, responsables directas de la secreción de gonadotropinas (Finch, 1993).

Las alteraciones en el control de la secreción de gonadotropinas por el SNC durante la etapa de envejecimiento, han sido atribuidas a los sistemas monoaminérgicos implicados en la modulación de la liberación de la GnRH (Barraclough y Wise, 1982 ; Clemens y Meites, 1971). En roedores machos de dos años de edad se ha descrito que en el hipotálamo medio, la tasa de recambio de las neuronas noradrenérgicas está reducida en un 25 % (Simpkins y col., 1977) , mientras que en el hipotálamo medio basal de ratas y ratones machos de dos años de edad, la dopamina disminuye de un 10% a un 40 % (Demarest y col. 1980). Cambios similares en las concentraciones basales de monoaminas son reportados para las hembras senescentes de los roedores (Rogers y Bloom, 1985).

En las hembras, la pérdida de la ciclicidad puede asociarse a cambios en la densidad de receptores $\alpha 1$ -adrenérgicos a nivel del SNC y al contenido o la actividad neural noradrenérgica (Estes y Sympkins, 1984, Weiland y col. 1989). En ratas intactas que presentan cornificación vaginal persistente se observa una disminución en la concentración de noradrenalina en el área preóptica y en el hipotálamo medio basal (Simpkins, 1984), otros autores han mostrado en ratas viejas disminución del neurotransmisor en el núcleo preóptico medial y en el núcleo supraquiasmático (Weiland y col. 1989).

Por el contrario, trabajos realizados por otros autores reportan que la noradrenalina aumenta en la eminencia media y en el hipotálamo ventro medial (Weiland, y col. 1989).

En hipofisis *in vitro* de ratas adultas jóvenes o viejas, el estímulo con GnRH induce disminución en la liberación de LH (Smith y col. , 1982); sin embargo el trasplante de hipofisis de ratas viejas acíclicas en ratas jóvenes es capaz de mantener la ciclicidad del animal (Peng y Huang, 1972). En ratas jóvenes o viejas ovariectomizadas a las que se les administra durante cinco días concentraciones fisiológicas de estradiol, el estímulo con GnRH es capaz de inducir el aumento brusco de LH (Peluso y col. 1977) . Estos resultados permiten sugerir que la falla del eje no se encuentra a nivel hipofisario.

Las concentraciones altas de estrógenos modificarían no sólo la sensibilidad hipofisaria, sino también la hipotalámica. Brawer y col. (1983) sugieren que la exposición del hipotálamo de la hembra al pico preovulatorio de estrógenos y aún a concentraciones basales puede ser fundamental en el envejecimiento del hipotálamo, en donde se observa que los estrógenos inducen aumento en la actividad de los astrocitos. La testosterona también puede influir en estos procesos, ya que se ha demostrado que el hipotálamo posee el sistema enzimático para aromatizarla (Naftolin y col. 1976) .

La participación de la inervación en el control de la ovulación.

En el ovario pueden distinguirse tanto componentes simpáticos como parasimpáticos del sistema nerviosos autónomo, los cuales penetran al ovario vía el plexo hiliar perivascular.

La inervación simpática es aportada por el plexo ovárico, rama de los plexos aórtico y renal, y por el nervio ovárico superior que se origina a partir del ganglio celiaco (Burden, 1985).

Por el plexo ovárico transcurre información de tipo sensorial, los neurotransmisores clásicos en este tipo de inervación son la substancia P (SP), el gen relacionado con el péptido de la calcitonina (CGRP) y la noradrenalina. Mientras que, por el nervio ovárico superior transcurre el neuropéptido Y (NPY), el péptido intestinal vasoactivo (VIP) y la noradrenalina (Lawrence y Burden, 1980; Ahmed y col., 1986). El mayor aporte de noradrenalina que recibe la gónada es por el nervio ovárico superior; además se ha mostrado que el ovario presenta células cromafines capaces de realizar la síntesis *de novo* de este neurotransmisor (Bahr y Ben-Jonathan, 1984). La actividad secretora de este tipo celular varía durante el ciclo estral (Wrutniak-Zolnowska 1980).

Por estudios de inmunohistofluorescencia se ha demostrado que los plexos nerviosos están estrechamente relacionados con folículos primordiales y con folículos en desarrollo, haciendo contacto con las células de la teca y el músculo liso perifolicular pero sin entrar a la granulosa ni a los cuerpos lúteos. La cantidad de fibras nerviosas presentes en la gónada varía con la especie, las hay desde las densamente innervadas como la cobaya y la gata, hasta las de inervación escasa como la rata (Burden, 1985).

Aguado y col. (1982) han descrito que las células de la teca y de la granulosa del ovario de la rata presentan receptores a catecolaminas del subtipo β_2 . El número y la actividad de estos receptores están en función del estado fisiológico del animal, así la mayor concentración de estos receptores se encuentra antes de la ovulación (Jordan, 1981).

Se ha propuesto que adicional al control ejercido por las hormonas, la información que transcurre por los nervios ováricos podría estar modulando la secreción de esteroides y la respuesta del ovario a las gonadotropinas (Kawakami y col., 1981). Al parecer, la modulación que ejerce la inervación sobre las funciones ováricas se inicia desde etapas tempranas del desarrollo. En la rata el proceso de foliculogénesis se lleva a cabo en las primeras 48-72 horas de vida, a pesar de que los receptores a FSH y LH no están presentes (Malamed y col., 1992). Así mismo, se postula que la inervación participa en los mecanismos de selección de aquellos folículos que van a llegar a ovular en respuesta al pico preovulatorio de LH (Burden, 1985).

Brink y Grob (1973) observan que en ratones sometidos a desnervación unilateral existe un decremento significativo en el número de folículos maduros del ovario desnervado, y que no existe respuesta de crecimiento folicular al estímulo con gonadotropinas. En la rata adulta la sección del nervio ovárico superior, principal fuente de inervación noradrenérgica al ovario, provoca disminución de la tasa ovulatoria por el ovario desnervado y falta de respuesta a la administración de hCG (Chávez, et al 1991).

Estudios *in vitro* con células teco-intersticiales han mostrado que la secreción de andrógenos en respuesta al estímulo con hCG incrementa cuando se agregan agonistas adrenérgicos al medio (Dyer y Erickson, 1985).

En la rata prepúber la desnervación farmacológica por la administración de guanetidina (fármaco que destruye selectivamente las terminales simpáticas) retrasa la edad de apertura vaginal y la primera ovulación (Flores y col. 1990; Lara y col. 1990), modifica la distribución de la población folicular, reduce el número de receptores β -adrenérgicos en las células de la granulosa y provoca disminución de las concentraciones plasmáticas de LH (Lara y col. 1990). En la

rata adulta la administración de guanetidina induce una disminución en la cuota ovulatoria (Flores y col., 1990), mientras que en la cobaya la simpatectomía inducida por la administración de 6-OHDA no modifica el número de cuerpos lúteos (Curry y col. 1984)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En las últimas décadas se han sumado las evidencias que apoyan la idea de que en el control del crecimiento folicular y de la ovulación participa la inervación simpática. En el caso de la rata la modulación que ejerce esta inervación cambia con la edad del animal, es de tipo estimulante en la prepúber e inhibitoria para la adulta.

Por otra parte y como se ha mencionado anteriormente, el envejecimiento reproductivo es el resultado de cambios fisiológicos a nivel del sistema nervioso central y de las propias gónadas; cambios que dependen de la especie y aún de la raza en estudio

A la fecha no ha sido esclarecido cual es el papel que juega la inervación simpática en este proceso de envejecimiento y, dado que previamente hemos mostrado que la concentración de noradrenalina ovárica se incrementa en los animales viejos (Rosas y col. 1995), en este estudio se decidió analizar la participación de la inervación simpática en la pérdida de la ciclicidad y la ovulación espontánea que caracterizan a la senescencia reproductiva así como la respuesta del folículo a la estimulación gonadotrópica .

HIPÓTESIS

En la rata prepúber y adulta joven, la inervación simpática del ovario modula la respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas. A medida que la rata envejece se incrementa la concentración de noradrenalina ovárica y no se produce la ovulación espontánea. Por lo que en el animal viejo la desnervación simpática, inducida por la administración de guanetidina, restablecerá la respuesta ovulatoria ante el estímulo gonadotrópico

OBJETIVO

- Estudiar la participación de la innervación catecolaminérgica del ovario en la modulación de los eventos que conducen a la senescencia reproductiva

METAS

1. Caracterizar los eventos de la pérdida de la ciclicidad vaginal y de la ovulación espontánea durante el proceso de envejecimiento reproductivo.
2. Cuantificar la concentración de monoaminas en el hipotálamo anterior (POA-AHA) e hipotálamo medio basal (HMB) y la concentración plasmática de 17- β estradiol y progesterona en ratas adultas jóvenes y viejas intactas.
3. Evaluar la respuesta del ovario al estímulo hormonal con gonadotropinas en la rata adulta vieja intacta o desnervada farmacológicamente con guanetidina.
4. Cuantificar la concentración de monoaminas en hipotálamo anterior (POA-AHA) e hipotálamo medio basal (HMB) en ratas adultas jóvenes y viejas con desnervación simpática por guanetidina con o sin estímulo gonadotrópico.
5. Cuantificar la concentración plasmática de 17- β estradiol y progesterona en ratas viejas con desnervación simpática.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras adultas jóvenes y viejas de la cepa CII-ZV, mantenidas con fotoperiodo de 14 h de luz (de 5:00 a 19:00 h) y 10 h de oscuridad, temperatura ambiente y libre acceso al agua y alimento.

Estudio del ciclo estral

En todos los animales se realizó el estudio del ciclo estral por la toma diaria de frotis vaginales que fueron teñidos con hematoxilina - eosina (H-E). El análisis se llevó a cabo por medio de un índice de ciclicidad basado en la frecuencia de estros observados según el cociente :

$$\text{Índice de ciclicidad (IC)} = \frac{\text{número de estros registrados}}{\text{número total de días evaluados}}$$

Los valores que se obtuvieron permitieron tipificar la citología vaginal de un determinado grupo; cuando un animal fue ciclico se obtuvo un valor de 0.25 , cuando el valor fue mayor indicó una alta incidencia de estros y cuando fue menor los estros fueron escasos.

Procedimiento de autopsia

Se pesó al animal y fue sacrificado por decapitación entre las 11:00 y 13:00 h. Se colectó la sangre del tronco en un tubo de ensaye, se centrifugó por 15 minutos a 3000 rpm y se extrajo el suero para la cuantificación de 17β -estradiol y progesterona por RIA utilizando un kit de fase sólida (COT-A-COUNT™; apéndice).

El cerebro se extrajo rápidamente, se colocó en solución salina fría y se disecaron las áreas preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA) e hipotálamo medio basal (HMB), las que se conservaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta la cuantificación de monoaminas por cromatografía líquida de alta resolución HPLC como se describe en el apéndice (Hadfield et al.; 1985).

La actividad neuronal se calculó como el cociente de la concentración del metabolito entre la concentración del neurotransmisor (Kerdelhué 1989). El metabolito utilizado para noradrenalina fue MHPG; para dopamina DOPAC y para serotonina 5-HIAA.

La hipófisis se disecó y se pesó en balanza de precisión. En el tronco se practicó un corte en el abdomen abarcando piel y músculo empezando 2 cm arriba de la vagina sobre la línea media y extendiéndose hacia izquierda y derecha hasta poner al descubierto la cavidad peritoneal, una vez identificados, se disecaron los ovarios y el útero y se pesaron en balanza de precisión. Con ayuda de un microscopio estereoscópico se disecaron los oviductos y en ellos se contaron los ovocitos, según la metodología habitual del laboratorio (Chávez et al. ; 1991). El corte quirúrgico se prolongó hasta la cavidad torácica de donde se disecó el timo del cual se obtuvo el peso.

Los datos de peso de los órganos, la concentración de monoaminas hipotalámicas y de esteroides en el plasma fueron analizados utilizando la prueba t-Student. El número de ovocitos liberados se analizó por la prueba de Kruskal-Wallis seguido por la prueba de U de Mann Whitney. La tasa de animales ovulantes (número de animales ovulantes entre el número total) se analizó por la prueba exacta de Fisher. Sólo se tomaron como válidas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor al 5%.

1. Caracterización de la ciclicidad, ovulación, concentración plasmática de estradiol y progesterona y concentración tisular de monoaminas hipotalámicas en ratas hembras viejas de la cepa CII-ZV.

En la literatura se han descrito los eventos fisiológicos que permiten caracterizar al animal viejo y, se puede apreciar que la edad en la que la rata envejece depende de factores intrínsecos. Dado que de la cepa CII-ZV se desconocía la edad a la que se empiezan a manifestar estos cambios que conllevan a la senescencia reproductiva, se decidió tipificar nuestra cepa de animales.

A ratas adultas de la cepa CII-ZV de 3, 12, 15, 18 y 20 meses de edad se les realizó el seguimiento del ciclo estral por la toma diaria de frotis vaginales. De los animales de tres meses se utilizaron sólo aquellos que presentaron 2 ciclos consecutivos de 4 días de duración. De las hembras de 12

a 18 meses de edad se utilizaron aquellas que presentaron cornificación vaginal persistente y de las ratas de 20 meses de edad se seleccionaron las que presentaron diestro continuo.

En todos los casos se cuantificó estradiol y progesterona en suero, monoaminas en área preóptica hipotalámica anterior e hipotálamo medio basal y se obtuvo el peso de los órganos.

2. Respuesta ovulatoria al reemplazo hormonal con gonadotropinas en la rata vieja intacta o con desnervación catecolaminérgica inducida por la administración de guanetidina.

Se ha postulado que la modulación que ejerce la innervación catecolaminérgica en la respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas, depende de la edad del animal. Así, se sugiere que es de tipo inhibitorio en la rata prepúber y estimulante en la adulta (Flores y col., 1990; Lara y col., 1990).

Para estudiar la posible interacción entre los cambios que caracterizan al proceso de envejecimiento y la información neural que recibe el ovario se realizó el siguiente experimento con base al modelo obtenido después de haber realizado la caracterización de la cepa.

A ratas adultas de la cepa CII-ZV de 3, 12 ó 18 meses de edad, se les realizó el seguimiento del ciclo estral por la toma diaria de frotis vaginales. De los animales de tres meses se utilizaron sólo aquellos que presentaron al menos dos ciclos consecutivos de 4 días de duración. De las ratas de 12 y 18 meses de edad se utilizaron aquellas que presentaron estro vaginal persistente.

Para todas las edades mencionadas se formaron los siguientes grupos experimentales:

1. Testigo absoluto (TA): Animales intactos de 3, 12 ó 18 meses de edad sacrificados al estro vaginal.
2. Desnervación catecolaminérgica (GTD): Se inyectó por vía subcutánea una dosis 20 mg/kg de peso corporal de guanetidina monosulfatada (Sigma, St Louis, MO, USA). El fármaco se administró diariamente durante ocho días .
3. Solución salina (SS): En este grupo experimental se administró solución fisiológica en la secuencia y volumen utilizado en el grupo anterior.
4. Ovulación inducida (Gnt's): Se inyectó por vía subcutánea 45 u.i. de gonadotropina del suero de la yegua preñada (PMSG; Sigma, St Louis, MO, USA), 56 horas después 30 u.i. de gonadotropina coriónica humana (hCG; Sigma, St Louis, MO, USA), y se les sacrificó 20 h después.
5. Ovulación inducida en la rata desnervada (GTD+Gnt's): A hembras de 3, 12 ó 18 meses de edad se les realizó la desnervación catecolaminérgica con GTD y al quinto día del tratamiento se realizó la prueba de ovulación inducida.

RESULTADOS

1. Caracterización de la ciclicidad, ovulación, concentración plasmática de estradiol y progesterona y concentración tisular de monoaminas hipotalámicas en ratas hembras viejas de la cepa CII-ZV.

1. Ciclicidad y ovulación

La rata de tres meses de edad (adulta joven) de la cepa CII-ZV se caracteriza por presentar ciclos estrales de 4 días de duración (diestro 1, diestro 2, proestro, estro). El 100% (13/13) de los animales ovularon en el día del estro esperado con una cuota de 11.2 ± 0.5 ovocitos, sin diferencias entre los liberados por el ovario izquierdo y el derecho (6.1 ± 0.5 vs 5.2 ± 0.5 , NS).

De los 12 a los 18 meses de edad los animales fueron acíclicos y más del 90% presentaron estro vaginal persistente sin que se observaran signos de ovulación espontánea. A la edad de 20 meses el frotis vaginal se caracterizó por una mayor incidencia de diestros, con algunos días de estro intercalados, sin presentar proestros. Aproximadamente el 5% de los animales de 20 meses presentaron anestro (unicamente diestros). La tabla 1 muestra el valor del índice de ciclicidad para estos animales.

Edad en meses	Índice de ciclicidad
3	0.25 ± 0.00
12	0.74 ± 0.07
15	0.78 ± 0.06
18	0.82 ± 0.04

Tabla 1. Índice de ciclicidad para animales intactos adultos jóvenes y viejos.

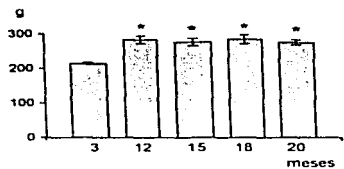
II . Peso de los órganos

El peso corporal de los animales viejos (12 a 20 meses de edad) fue significativamente mayor al de los animales jóvenes (Fig. 1a).

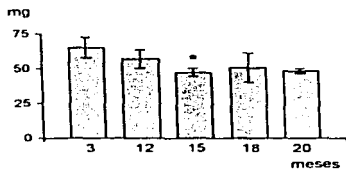
El peso de los ovarios de las ratas viejas mostró una tendencia a la disminución que llegó a ser estadísticamente significativa sólo a los 15 meses, respecto a las ratas jóvenes (Fig. 1b); el útero mostró una notoria hipertrofia a partir de los 12 meses de edad (12 meses 726.39 ± 69.18 mg vs 3 meses 363.92 ± 17.32 mg, $p < 0.05$) que se mantiene hasta los 20 meses (Fig. 1c).

El peso del timo de las ratas viejas disminuyó significativamente cuando se les comparó con la rata de 3 meses (Fig. 1d). El peso de la hipófisis no presentó diferencias entre las edades estudiadas.

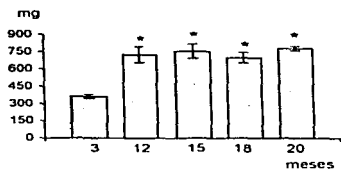
a) Peso corporal



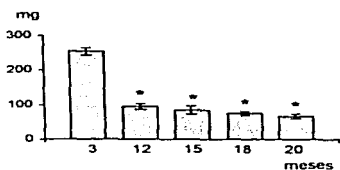
b) Masa ovárica



c) Útero



d) Timo



* $p < 0.05$ vs 3 meses (prueba t-Student)

Fig. 1. Media \pm e.e.m. del peso corporal (g), peso de los ovarios, útero y timo (mg) de ratas adultas sacrificadas a diferentes edades.

III. Concentración y actividad de los sistemas monoaminérgicos

Área Preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA)

La concentración de noradrenalina en POA-AHA de una rata joven fue de 2.19 ± 0.41 , ésta concentración se duplicó en el animal viejo, desde los 12 hasta los 20 meses de edad. La concentración de dopamina se incrementó en las hembras de 15 a 20 meses de edad. Mientras que la concentración de serotonina no se modificó en las ratas viejas (tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-IIT) en POA-AHA de ratas hembras intactas sacrificadas a diferentes edades.

GRUPO	n	NA	DA	5-IIT
3 meses	7	2.19 ± 0.41	0.24 ± 0.07	1.63 ± 0.50
12 meses	10	$4.41 \pm 0.60 *$	0.87 ± 0.36	2.40 ± 0.05
15 meses	11	$4.43 \pm 0.43 *$	$1.37 \pm 0.26 *$	1.95 ± 0.31
18 meses	10	$4.42 \pm 0.39 *$	$0.96 \pm 0.21 *$	2.02 ± 0.28
20 meses	12	$5.76 \pm 0.54 *$	$1.91 \pm 0.44 *$	1.75 ± 0.26

* $p < 0.05$ vs 3 meses (prueba t-Student)

En la Fig. 2 se muestra de manera gráfica el incremento de la concentración de noradrenalina que se observó a partir de los 12 meses de edad.

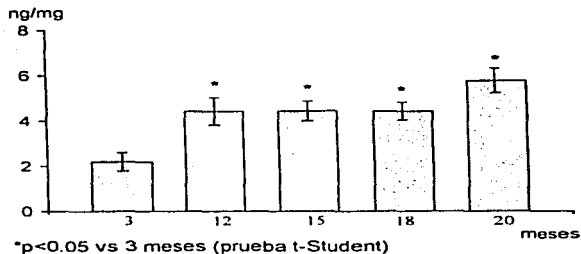


Fig. 2. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg) de noradrenalina en POA-AHA de ratas hembras intactas sacrificadas a diferentes edades.

En los animales viejos la actividad neuronal noradrenérgica en POA-AHA fue significativamente menor, comparada con la calculada para las ratas de 3 meses (Fig. 3).

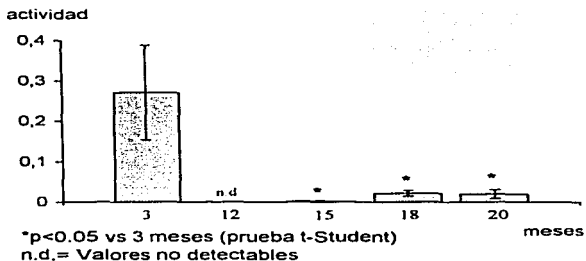


Fig. 3. Media \pm e.e.m. de la actividad neuronal noradrenérgica en POA-AHA de ratas hembras intactas sacrificadas a diferentes edades.

La actividad neuronal dopaminérgica en POA-AHA fue significativamente mayor para las ratas viejas al compararla con la registrada para las hembras jóvenes (Fig. 4).

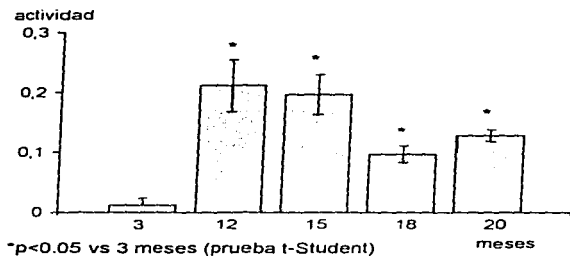


Fig. 4. Media \pm e.c.m. de la actividad neuronal dopaminérgica en POA-AHA de ratas hembras intactas sacrificadas a diferentes edades.

La actividad neuronal serotoninérgica se incrementó en POA-AHA de las hembras de 13 y 15 meses (Fig. 5).

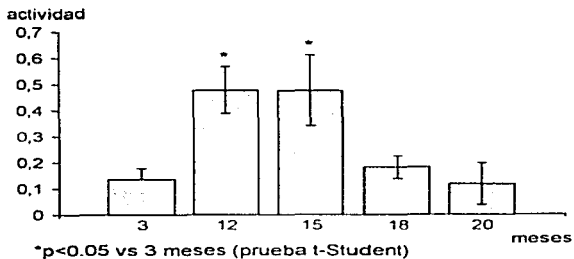


Fig. 5. Media \pm e.e.m. de la actividad neuronal serotoninérgica en POA-AHA de ratas hembras intactas sacrificadas a diferentes edades.

Hipotálamo medio basal (HMB)

En las ratas viejas la concentración de noradrenalina, dopamina y serotonina fue semejante a la registrada en la hembra cíclica de 3 meses de edad (tabla 3).

Tabla 3. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en HMB de ratas hembras intactas sacrificadas a diferentes edades.

Edad	n	NA	DA	5-HT
3 meses	7	2.90 \pm 0.50	0.83 \pm 0.17	2.06 \pm 0.39
13 meses	10	2.76 \pm 0.21	0.69 \pm 0.49	0.94 \pm 0.40
15 meses	12	2.97 \pm 0.24	0.61 \pm 0.05	1.49 \pm 0.22
18 meses	9	3.93 \pm 0.37	1.18 \pm 0.14	2.51 \pm 0.79
20 meses	11	2.96 \pm 0.13	0.72 \pm 0.17	1.45 \pm 0.15

La actividad de la neurona dopaminérgica y serotoninérgica no se modificó en los animales viejos (Tabla 4).

Tabla 4. Media \pm e.e.m. de la actividad de la neurona noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica en el HMB de ratas hembras intactas sacrificadas a diferentes edades.

Edad	NA	DA	5-HT
3 meses	0.085 \pm 0.024	0.070 \pm 0.027	0.876 \pm 0.702
12 meses	0.002 \pm 0.002 *	0.042 \pm 0.032	0.324 \pm 0.143
15 meses	0.011 \pm 0.003 *	0.096 \pm 0.017	0.730 \pm 0.137
18 meses	0.006 \pm 0.006 *	0.024 \pm 0.010	0.278 \pm 0.082
20 meses	0.014 \pm 0.004 *	0.077 \pm 0.018	0.120 \pm 0.088

* $p < 0.05$ vs 3 meses (prueba t-Student)

La actividad neuronal noradrenérgica fue significativamente menor en los grupos de animales viejos (Fig. 6).

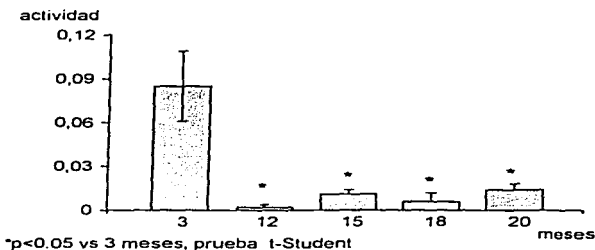


Fig. 6. Media \pm e.e.m. de la actividad neuronal noradrenérgica en HMB de ratas hembras intactas sacrificadas a diferentes edades.

IV. Concentración de estradiol y progesterona en plasma

En los animales de 12 meses de edad la concentración plasmática de 17β -estradiol fue significativamente mayor comparada con un animal cíclico en el día del diestro 1, pero semejantes al día del estro (Fig. 7). Las hembras de 18 y 20 meses de edad presentaron una concentración similar a la observada en la rata joven en diestro 1. Sólo en la rata de 20 meses la concentración de la hormona fue menor a la del animal cíclico en la mañana del estro.

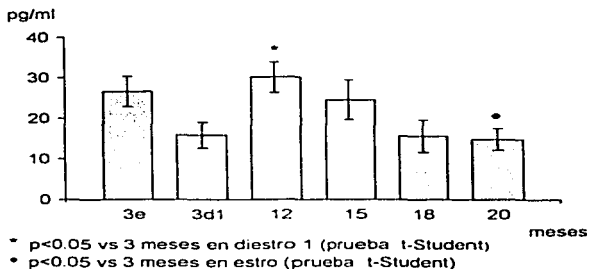


Fig 7. Media \pm e.c.m. de la concentración (pg/ml) de 17β -estradiol en el suero de ratas cíclicas sacrificadas al estro (3 e) o al diestro-1 (3 d1) o de ratas viejas a diferentes edades.

Las concentraciones de plasmáticas de progesterona en las ratas de 12 a 18 meses de edad fueron semejantes a las registradas en una animal cíclico en

diestro-1 o estro. En tanto que a los 20 meses de edad se observó disminución significativa del esteroide comparado al del diestro-1 (Fig. 8).

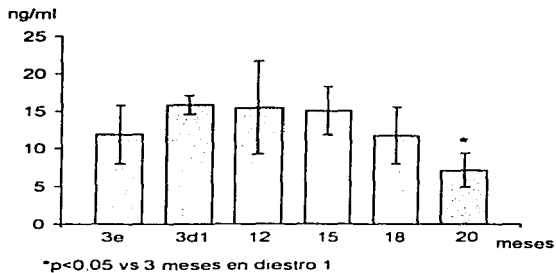


Fig. 8. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/ml) de progesterona en el suero de ratas cíclicas sacrificadas al estro (3 e) o al diestro-1 (3 d1) o de ratas viejas a diferentes edades.

2. Respuesta ovulatoria al reemplazo hormonal con gonadotropinas en la rata vieja intacta o con desnervación catecolaminérgica inducida por la administración de guanetidina.

A) 3 meses de edad

1. Ciclicidad y ovulación

Ninguno de los parámetros evaluados se modificó por la administración de solución salina, por lo que los resultados de los grupos tratados farmacológicamente se compararon con el grupo testigo absoluto.

El patrón de ciclicidad vaginal no se modificó por la desnervación, la estimulación gonadotrópica o la combinación de estos tratamientos.

El 100% de los animales intactos o tratados con solución salina ovularon al estro vaginal; en tanto que, sólo 6/11 lo hicieron ante la desnervación farmacológica con GTD ($p < 0.05$). La tasa de ovulación en los grupos de animales intactos o desnervados que recibieron estímulo gonadotrópico fue igual al grupo testigo (Fig. 9).

La cuota ovulatoria de los animales estimulados con gonadotropinas fue semejante a la observada en el grupo testigo. La desnervación provocó disminución significativa en el número de ovocitos liberados (Fig. 10), esta disminución está dada principalmente por el ovario derecho (1.55 ± 0.50 vs 5.15 ± 0.48 ovocitos $p < 0.05$). En el animal desnervado el estímulo con gonadotropinas produjo un aumento en el número total ovocitos liberados, respecto al grupo testigo (21.30 ± 1.63 vs 11.23 ± 0.54 $p < 0.05$).

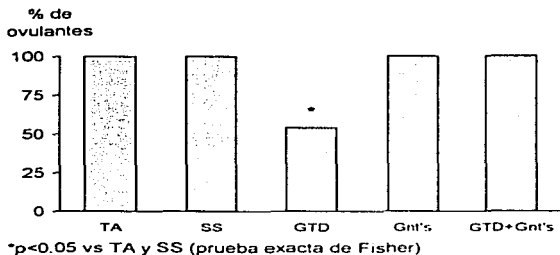


Fig. 9. Porcentaje de animales ovulantes en ratas de 3 meses de edad, testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

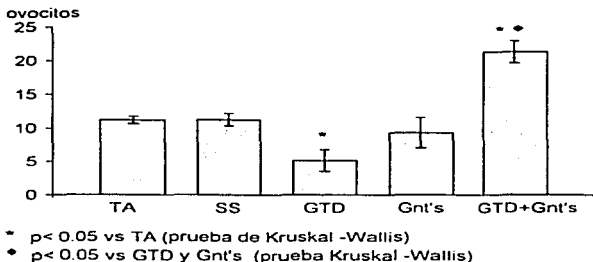
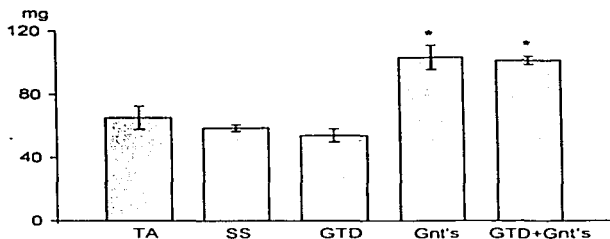


Fig. 10. Media \pm e.c.m. del número de ovocitos liberados por ratas de 3 meses de edad, testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

II. Peso de los órganos

La administración de gonadotropinas en el animal intacto o desnervado produjo un aumento significativo de la masa de los ovarios respecto al grupo testigo (Fig. 11). Mientras que el peso corporal, el útero e hipófisis no se modificó y sólo en los animales intactos estimulados con gonadotropinas el peso del timo disminuyó significativamente (tabla 5).



* $p < 0.05$ vs TA (prueba t-Student)

Fig. 11. Media \pm e.c.m. de la masa ovárica(mg) de ratas de 3 meses de edad testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Tabla 5. Media \pm e.e.m. del peso corporal, peso del útero, hipófisis y timo de ratas de 3 meses de edad testigo absoluto (TA) tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Grupo	Peso corporal (g)	Útero (mg)	Hipófisis (mg)	Timo (mg)
TA	214.72 \pm 3.08	363.92 \pm 17.32	13.26 \pm 1.28	253.44 \pm 10.54
Salina	221.00 \pm 3.87	304.39 \pm 12.19 *	11.66 \pm 0.57	188.77 \pm 38.20
GTD	202.89 \pm 6.78	333.65 \pm 14.58	13.66 \pm 0.72	215.93 \pm 8.24
Gnt's	233.09 \pm 13.31	378.88 \pm 33.89	15.06 \pm 1.17 *	195.47 \pm 14.32*
GTD+Gnt's	215.17 \pm 4.06	364.58 \pm 17.73	13.05 \pm 0.91	216.42 \pm 23.68

* $p < 0.05$ vs TA (prueba t-Student)

* $p < 0.05$ vs SS (prueba t-Student)

III. Concentración y actividad de los sistemas monoaminérgicos

Área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA).

En la rata intacta la administración secuencial de gonadotropinas provocó incremento en la concentración de noradrenalina, similar al que se observó en el animal desnervado con el mismo estímulo hormonal. La concentración de dopamina no se modificó en ninguno de los grupos experimentales; mientras que en el animal desnervado y estimulado con gonadotropinas se incrementó la concentración de serotonina, respecto a la del animal tratado con guanetidina (Tabla 6).

Tabla 6. Media \pm e.c.m. de la concentración (ng/ mg) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en POA-AHA de ratas adultas de 3 meses de edad testigo absoluto (TA), tratadas con guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Grupo	n	NA	DA	5-HT
TA	7	2.19 \pm 0.41	0.24 \pm 0.07	1.63 \pm 0.50
Gnt's	11	4.79 \pm 0.74 *	0.23 \pm 0.12	2.46 \pm 0.13
GTD	7	2.90 \pm 0.36	0.47 \pm 0.71	0.64 \pm 0.51
GTD+Gnt's	11	4.05 \pm 0.50 *	0.87 \pm 0.46	2.45 \pm 0.31*

* p< 0.05 vs TA (prueba t-Student)

* p< 0.05 vs GTD (prueba t-Student)

La desnervación simpática o la estimulación con PMSG-hCG no modificó la actividad neuronal noradrenérgica, en tanto que el tratamiento hormonal en hembras previamente desnervadas provocó disminución de la actividad de este sistema de neurotransmisión. En el animal intacto, de 3 meses de edad, la actividad dopaminérgica no se detectó con el método utilizado; la desnervación simpática, el reemplazo hormonal o la combinación de ambas indujeron aumento de la actividad. La actividad serotoninérgica mostró aumento significativo en los animales con desnervación simpática o estímulo con gonadotropinas (Tabla 7).

Tabla 7. Media \pm e.c.m. de la actividad de la neurona noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica en POA-AHA de ratas adultas de 3 meses de edad testigo absoluto (TA), tratadas con guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Grupo	n	NA	DA	5-HT
TA	7	0.271 \pm 0.117	no detectable	0.137 \pm 0.041
Gnt's	11	0.019 \pm 0.053	0.213 \pm 0.099	0.614 \pm 0.135*
GTD	7	0.049 \pm 0.021	0.037 \pm 0.014	0.027 \pm 0.017*
GTD+Gnt's	11	0.006 \pm 0.003 *	0.360 \pm 0.273	0.271 \pm 0.089

*p<0.05 vs TA

Hipotálamo medio basal (HMB)

La desnervación inducida por guanetidina incrementó la concentración de noradrenalina. La administración de gonadotropinas en el animal intacto o desnervado no modificó la concentración de los neurotransmisores evaluados (tabla 8).

Tabla 8. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/ mg) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en HMB de ratas adultas de 3 meses de edad testigo absoluto (TA), tratadas con guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

GRUPO	NA	DA	5-HT
TA	2.90 \pm 0.51	0.83 \pm 0.17	2.06 \pm 0.39
GNTS	3.42 \pm 0.38	2.30 \pm 0.85	2.10 \pm 0.43
GTD	4.44 \pm 0.15 *	2.67 \pm 1.34	2.59 \pm 0.01
GTD+Gnt's	3.70 \pm 0.33	0.93 \pm 0.34	1.21 \pm 0.24

* $p < 0.05$ vs TA (prueba t-Student).

B) 12 meses de edad

1. Ciclicidad y ovulación

En nuestra cepa de animales el frotis vaginal de las ratas de 12 meses de edad se caracteriza por la presencia de estro vaginal persistente; en donde predominan las células de descamación (estro típico), aunque se pueden encontrar en menor proporción leucocitos y células nucleadas.

La desnervación provocó modificaciones en la citología vaginal, de manera que el 50% de los animales presentó varios días de diestro.

La ovulación espontánea ya no se presentó en los animales intactos, tratados con solución salina o desnervados. El tratamiento con gonadotropinas indujo la ovulación en 5 de 13 animales. Esta respuesta fue semejante si el animal es previamente desnervado (Fig. 12).

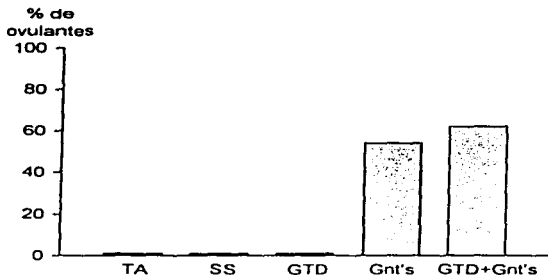


Fig. 12. Porcentaje de animales ovulantes en ratas de 12 meses de edad, testigo absoluto (TA) tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Del 38% de animales que ovularon ante el estímulo con gonadotropinas la cuota ovulatoria por ambos ovarios fue de 2.40 ± 1.30 , donde el ovario izquierdo ovuló 1.25 ± 0.95 y el derecho 1.40 ± 0.57 ovocitos. Cuando se realizó la misma sustitución hormonal en el animal desnervado liberaron un número total de 5.5 ± 1.22 ovocitos, el ovario izquierdo ovuló 3.17 ± 0.95 y el derecho 2.33 ± 0.67 ovocitos, sin llegar a ser diferentes estadísticamente respecto al grupo estimulado con PMSG-hCG (Fig. 13).

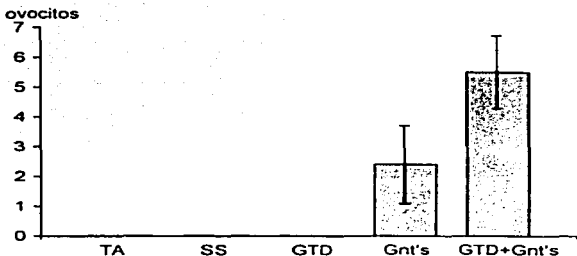
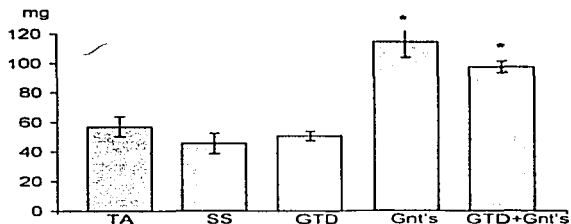


Fig. 13. Media \pm e.c.m. del número de ovocitos totales liberados por ratas de 12 meses de edad, testigo absoluto (TA) tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

II. Peso de los órganos

La masa ovárica de los animales desnervados o tratados con solución salina fue semejante al grupo testigo. La sustitución hormonal en el animal intacto o en el desnervado provocó incremento significativo en el peso de los ovarios (Fig. 14).



* $p < 0.05$ vs TA y SS (prueba t-Student)

Fig. 14. Media \pm e.c.m. de la masa ovárica(mg) de ratas de 12 meses de edad testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

En el grupo con desnervación simpática disminuyó el peso corporal y el peso del timo, respecto al registrado en ratas intactas (tabla 9).

Tabla 9. Media \pm e.c.m. del peso corporal, útero, hipófisis y timo de ratas de 12 meses edad testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Grupo	n	Peso corporal (g)	Útero (mg)	Hipófisis (mg)	Timo (mg)
TA	13	283.50 \pm 11.13	726.39 \pm 69.18	15.3 \pm 0.84	94.66 \pm 8.00
SS	6	255.00 \pm 11.92	637.95 \pm 71.63	14.92 \pm 1.26	80.70 \pm 8.42
GTD	12	249.53 \pm 11.67*	568.66 \pm 41.22	14.06 \pm 1.58	67.74 \pm 8.01*
Gnt's	13	265.05 \pm 6.60	670.26 \pm 45.05	16.02 \pm 0.86	84.32 \pm 7.71
GTD+Gnt's	14	259.93 \pm 6.50	697.51 \pm 50.79	15.93 \pm 0.83	82.53 \pm 5.21

* $p < 0.05$ vs TA (prueba t-Student).

III . Concentración y actividad de los sistemas monoaminérgicos

Área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA)

En la rata de 12 meses de edad intacta o con denervación simpática, el estímulo con gonadotropinas no modificó la concentración de noradrenalina, dopamina o serotonina (Tabla 10).

Tabla 10. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en POA-AHA de ratas de 12 meses de edad testigo absoluto(TA), con estímulo gonadotrópico (Gnt's) o desnervadas y con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Grupo	n	NA	DA	5-HT
TA	10	4.41 \pm 0.60	0.87 \pm 0.36	2.40 \pm 0.05
Gnt's	11	5.25 \pm 0.59	0.78 \pm 0.08	3.18 \pm 0.58
GTD+Gnt's	8	6.10 \pm 1.23	1.42 \pm 0.39	2.72 \pm 0.49

En los animales intactos de 12 meses de edad no se detectó actividad para las neuronas noredrenérgicas, en estos animales el estímulo secuencial con PMSG-hCG incrementó la actividad de estas neuronas (0.200 ± 0.007), el mismo tratamiento hormonal en animales previamente desnervados no provocó cambios. En cuanto al sistema dopaminérgico el tratamiento hormonal disminuyó significativamente la actividad de la neurona (0.104 ± 0.009 vs 0.212 ± 0.043 , $p < 0.05$) y no se modificó si el animal es desnervado antes del estímulo gonadotrópico (0.138 ± 0.029 vs 0.212 ± 0.043 NS). La actividad serotoninérgica no se modificó con ninguno de los tratamientos.

Hipotálamo medio basal (HMB)

En el HMB la sustitución hormonal provocó aumento en la concentraciones de las tres monoaminas. En el animal desnervado y estimulado con gonadotropinas sólo se incrementó la concentración de noradrenalina (tabla 11).

Tabla 11. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en el HMB de ratas de 12 meses de edad testigo absoluto(TA), con estímulo gonadotrópico (Gnt's) o desnervadas y con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

GRUPO	n	NA	DA	5-HT
TA	10	2.76 \pm 0.21	0.69 \pm 0.49	0.94 \pm 0.40
Gnt's	11	6.30 \pm 0.98*	2.21 \pm 0.43*	2.60 \pm 0.55 *
GTD+Gnt's	8	5.87 \pm 1.26*	1.19 \pm 0.32	2.13 \pm 0.53

* $p < 0.05$ vs TA (prueba t-Student)

En el hipotálamo medio basal no se detectó actividad para las neuronas noreadrenérgicas, en estos animales el estímulo secuencial con PMSG-hCG incrementó la actividad de estas neuronas (0.023 ± 0.005), éste incremento fue aún mayor en los animales previamente desnervados (0.122 ± 0.009). En cuanto al sistema dopaminérgico, el tratamiento hormonal en el animal intacto no modificó la actividad de la neurona (0.111 ± 0.031 vs 0.042 ± 0.032 NS), ni en el animal desnervado (0.081 ± 0.014 vs 0.042 ± 0.032 NS). La actividad serotoninérgica no se modificó en ninguno de los grupos experimentales.

IV. Concentración plasmática de estradiol y progesterona

La desnervación farmacológica con GTD indujo un aumento en la concentración de estradiol que fue cinco veces mayor al testigo (30.2 ± 3.8 vs >150 pg/ml). La concentración plasmática de progesterona mostró disminución que no llegó a ser estadísticamente significativa (4.2 ± 1.4 vs 15.4 ± 6.2 ng/ml, NS).

C) 18 meses de edad

I. Ciclicidad y ovulación

Al igual que en las hembras de 12 meses de edad el frotis vaginal se caracteriza por la presencia de estro vaginal persistente; en donde predominan las células de descamación (estro típico), aunque se pueden encontrar en menor proporción leucocitos y células nucleadas. En los animales con o sin deservación simpática, el tratamiento secuencial de gonadotropinas no modificó la citología vaginal, es decir las ratas continuaron en estro vaginal persistente.

En el animal intacto de 18 meses de edad el estímulo gonadotrópico no induce ovulación. Esta falta de respuesta también se observó en el animal en el que se ha eliminado la información simpática por la administración de GTD.

II. Peso de los órganos

En la hembra de 18 meses de edad la deservación con GTD no modificó la masa ovárica, comparada con la del animal testigo (48.0 ± 8.25 vs 50.88 ± 10.53 , NS). La inyección de gonadotropinas en el animal intacto o en el animal deservado indujo un aumento en la masa ovárica (Fig. 15). El peso corporal y del útero no se modificó en los animales deservados con o sin estimulación gonadotrópica, en tanto que el peso del timo disminuyó significativamente en las hembras tratadas con GTD (tabla 12).

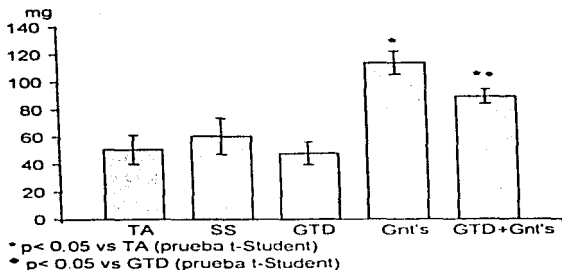


Fig. 15. media \pm e.e.m. de la masa ovárica de ratas de 18 meses de edad, testigo absoluto (TA) tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Tabla 12. Media \pm e.e.m. del peso corporal, útero, hipófisis y timo de ratas de 18 meses de edad testigo absoluto (TA), tratadas con solución salina (SS), guanetidina (GTD), gonadotropinas (Gnt's) o desnervadas y estimuladas con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

Grupo	n	Peso corporal (g)	Útero (mg)	Hipófisis (mg)	Timo (mg)
TA	10	284.30 \pm 12.33	700.64 \pm 45.42	17.54 \pm 1.27	75.38 \pm 5.49
SS	5	247.00 \pm 12.22	722.60 \pm 66.80	21.44 \pm 0.85*	62.22 \pm 7.00
GTD	12	260.17 \pm 8.56	681.87 \pm 50.00	18.82 \pm 1.30	52.16 \pm 3.86*
Gnt's	11	285.90 \pm 5.50	745.65 \pm 70.58	17.60 \pm 0.60	70.78 \pm 7.17
GTD+Gnt's	13	261.77 \pm 5.11	679.37 \pm 32.75	16.63 \pm 1.97	68.25 \pm 4.52

*p < 0.05 vs TA (prueba t-Student)

III. Concentración y actividad de los sistemas monoaminérgicos

Área preóptica hipotalámica anterior (POA-AHA)

En la rata de 18 meses de edad la desnervación farmacológica no modificó la concentración de noradrenalina, dopamina y serotonina. El estímulo gonadotrópico en el animal desnervado no produjo cambios en la concentración de las monoaminas (tabla 13) .

Tabla 13. Media \pm e.c.m. de la concentración (ng/mg) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en POA-AHA de ratas de 18 meses de edad testigo absoluto(TA), con desnervación simpática (GTD) o desnervadas y con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

GRUPO	n	NA	DA	5-HT
TA	10	4.424 \pm 0.391	0.957 \pm 0.213	2.021 \pm 0.284
GTD	9	3.721 \pm 0.436	3.397 \pm 1.351	2.450 \pm 0.245
GTD+Gnt's	9	4.706 \pm 0.499	2.431 \pm 0.939	2.374 \pm 0.183

La actividad de la neurona noradrenérgica en la hembra de 18 meses de edad fue de 0.022 ± 0.007 , la desnervación simpática depleta la actividad de este sistema y no es reestablecido por el estímulo con PMSG-hCG. El tratamiento con GTD disminuyó la actividad dopaminérgica (0.017 ± 0.009 vs 0.097 ± 0.014 , $p < 0.05$); en el animal desnervado la estimulación gonadotrópica la incrementó (0.162 ± 0.024 vs 0.097 ± 0.014 , $p < 0.05$).

Hipotálamo medio basal (HMB)

En la rata de 18 meses de edad la administración de GTD provocó disminución en la concentración de noradrenalina, esta disminución se presentó aún cuando el animal desnervado es sometido al tratamiento secuencial con PMSG-hCG.

La concentración de dopamina y serotonina no se modificó en estos grupos experimentales (tabla 14).

Tabla 14. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg) de noradrenalina (NA), dopamina (DA) y serotonina (5-HT) en HMB de ratas de 18 meses de edad testigo absoluto (TA), con desnervación simpática (GTD) o desnervadas y con gonadotropinas (GTD+Gnt's).

GRUPO	n	NA	DA	5-HT
TA	9	3.93 \pm 0.373	1.178 \pm 0.138	1.778 \pm 0.239
GTD	9	2.62 \pm 0.415 *	0.569 \pm 0.253	1.411 \pm 0.078
GTD+Gnt's	12	2.00 \pm 0.228 *	0.713 \pm 0.226	1.824 \pm 0.095

* $p < 0.05$ vs TA (prueba t-Student)

En el hipotálamo medio basal de los animales intactos no se detectó actividad para la neurona noradrenérgica, este mismo comportamiento se observó en la hembra con simpatectomía con o sin estimulación gonadotrópica. El tratamiento con GTD no provocó cambios en la actividad dopaminérgica (0.069 ± 0.160 vs TA= 0.024 ± 0.01 NS); en el animal desnervado la estimulación gonadotrópica la incrementó (0.454 ± 0.205 vs 0.024 ± 0.01 $p < 0.05$). La desnervación simpática provocó incremento en la actividad de la neurona serotoninérgica (1.921 ± 0.192 vs 0.278 ± 0.082 , $p < 0.05$) que se mantuvo cuando además se estimuló con gonadotropinas (1.057 ± 0.129 vs 0.278 ± 0.082 , $p < 0.05$).

DISCUSIÓN

Los resultados presentados en este trabajo muestran que en la rata de la cepa CII-ZV la pérdida de la función reproductora, ocurre alrededor de los 12 meses de edad y que está caracterizada por la ausencia del ciclo estral y de la ovulación espontánea. La inervación simpática modula los procesos neuroendócrinos que conllevan a la senescencia reproductiva.

La cepa de ratas estudiada tiene una esperanza de vida de 22 ± 2 meses en condiciones estándar de bioterio (observación personal). Conforme el animal va envejeciendo (12 meses de edad) aumenta el peso corporal, debido a la acumulación de tejido adiposo. Este aumento de peso es semejante a lo reportado para la rata con síndrome del ovario poliquístico, cuya citología vaginal corresponde a un estro persistente (Barria y col., 1993).

En los roedores la aciclicidad vaginal es un evento típico del proceso de envejecimiento reproductivo que se presenta entre los 6 y los 18 meses de edad, dependiendo de la cepa estudiada y está caracterizada por periodos de cornificación vaginal persistente (EVP) seguidos de anestro (vom Saal, 1994). En la cepa CII-ZV la pérdida del patrón del ciclo estral se presenta a los 12 meses de edad, la mayoría de los animales presenta estro vaginal persistente y solamente algunos de ellos (aproximadamente el 5%) llegaron a la condición de anestro a la edad de 20 meses.

En la literatura existe controversia acerca de a que nivel del eje hipotálamo-hipófisis-ovario, se desencadena el proceso de envejecimiento reproductivo. Algunos autores proponen que se inicia en el sistema nervioso central, por hiperactividad de los astrocitos y degeneración de las neuronas

(Brawer y col., 1983; Finch, 1993; Wise y col., 1996). Otros investigadores postulan que es a nivel del ovario donde se inician estos cambios que conducen al envejecimiento reproductivo, debido a la depleción de los folículos en crecimiento, al aumento de la atresia y a los cambios en la masa del tejido intersticial (Butcher y Page, 1981).

En los roedores senescentes la cornificación vaginal persistente es un indicador de que la secreción de los estrógenos es tónica, las concentraciones plasmáticas de progesterona son bajas y las de FSH son altas y los pulsos de LH no ocurren, lo que se traduce en la pérdida de la ovulación espontánea (Huang y col., 1978; Lu, 1983 ; Nelson y Felicio , 1985). En la cepa CII-ZV desde los 12 hasta los 15 meses de edad, la concentración de estradiol en el plasma es elevada y semejante a lo descrito en la literatura para animales viejos con la misma citología vaginal (Lu y col., 1981b). En respuesta a las condiciones endócrinas que prevalecen en la rata con EVP se observa hipertrofia del útero e involución conspicua en el timo, lo que nos permite sugerir que durante el proceso de envejecimiento la secreción tónica de estradiol induce cambios morfo-fisiológicos en varios órganos involucrados con la reproducción (vom Saal y col., 1994).

En las ratas viejas se ha descrito que la concentración plasmática de progesterona es aproximadamente la mitad de la concentración basal, registrada en el estro o en la mañana del diestro-1, de un animal cíclico (Huang, y col., 1978), estos resultados difieren a los mostrados en este estudio, donde la concentración de la hormona es similar a la basal de las ratas cíclicas. Estas evidencias nos permiten sugerir que los ovarios de las ratas CII-ZV presentan una mayor capacidad de sintetizar progesterona, lo que se podría probar si al darle colesterol marcado éste se transforma en progesterona.

Nelson y Felicio (1985) señalan que en la rata en EVP la cantidad de folículos es suficiente para dar una respuesta esteroidogénica. Esto se ve apoyado por el hecho de que en estos animales la concentración plasmática de la FSH es alta y la secreción es tónica (Huang y col., 1978). Las hembras senescentes de la cepa CII-ZV presentan receptividad sexual constante (datos no mostrados), en respuesta a la secreción elevada de estradiol, lo que permite sugerir que en los ovarios aún existe desarrollo folicular, sin que culmine con la ovulación espontánea por la falta del pico preovulatorio de LH.

Erickson y col. (1979) señalan que en los ovarios de animales con EVP, el número de receptores a la LH en las células de la granulosa es semejante al de un animal cíclico en el día del proestro. En el presente estudio se observó que sólo los ovarios de los animales de 12 meses de edad, en EVP, son capaces de ovular ante el estímulo secuencial de PMSG-hCG, lo que apoyaría que la falta de ovulación se debe a la ausencia de la elevación brusca de la LH y no a cambios en el número de sus receptores en el ovario. Sin embargo, el estímulo hormonal es capaz de inducir aumento de la masa ovárica independientemente de la edad de los animales; estos resultados difieren a lo mostrado por Talbert (1968), quienes señalan que la respuesta de aumento de peso de las gónadas decrece en función de la edad. Las discrepancias observadas entre estos estudios pueden deberse a la cepa de animales en estudio, así como al esquema de administración hormonal utilizado.

En el proceso de envejecimiento no sólo se suceden cambios a nivel de las gónadas sino también en el SNC. Las neuronas GnRH-érgicas forman una ruta llamada septo-preóptico infundibular que abarca las áreas preóptica, anterior, paraventricular y medial del hipotálamo (Silverman y col., 1994). La actividad secretora de estas neuronas es controlada por varios sistemas de

neurotransmisión, entre ellos los monoaminérgicos, cuya actividad es modulada por los estrógenos (Kordon y col., 1994). Se sabe que en el animal cíclico, el pico de estradiol que ocurre en la mañana del proestro induce una caída en la actividad dopaminérgica e incrementa la noradrenérgica por la tarde de este día (entre las 15:00 y las 17:00 horas); estos cambios estimulan a las neuronas GnRH-érgicas y provocan la secreción preovulatoria de gonadotropinas que se presenta en la tarde del proestro (Rance y col., 1981). Es posible que durante el envejecimiento reproductivo se produzcan cambios en los sistemas monoaminérgicos que se traducirían en la alteración de la secreción de la GnRH.

Weiland y col. (1989) muestran que en el núcleo preóptico medial del hipotálamo (NPM) de ratas que presentan EVP, la actividad neural noradrenérgica es menor, aunque la concentración del neurotransmisor sea similar a la de un animal cíclico en el día del estro. En el presente trabajo se observó que en las ratas en EVP la actividad neural noradrenérgica en POA-AHA es casi nula, mientras que la dopaminérgica es muy elevada, y dado que la secreción de estradiol se torna constante y moderadamente elevada, podemos proponer que la falta de ritmicidad en la secreción de este esteroide es la responsable del incremento en la actividad del sistema dopaminérgico y de la inhibición de la actividad noradrenérgica. Este conjunto de eventos se traduce en cambios del patrón de secreción de la GnRH y por ende de LH, lo que explicaría la falta de ovulación espontánea, aún cuando hay crecimiento folicular. Esto mismo nos lleva a postular que existe un factor de liberación para la LH (LHRH) y otro para la FSH (FSHRH).

Trabajos realizados por Lu y col., (1981a) muestran que si ratas jóvenes cíclicas o viejas en EVP son ovariectomizadas y cinco semanas después de la

operación se les administra una dosis de benzoato de estradiol seguida por una de progesterona, el patrón de secreción de la LH es semejante en amplitud para ambos grupos, aunque de menor magnitud en las ratas viejas. Esta respuesta no se presenta si la inyección de los esteroides se hace tres días después de la castración. Estos resultados apoyan la idea de que la descensibilización en el sistema nervioso central, inducida por el estradiol es reversible al inicio del envejecimiento, y serían los cambios en los patrones de secreción de los esteroides los que inducen la pérdida de la función reproductiva.

El conjunto de evidencias mostradas en este trabajo permite sugerir que el envejecimiento reproductivo inicialmente se manifiesta por cambios en el patrón de secreción de las hormonas sexuales y que al parecer están modulados por la inervación intrínseca de la gónada.

Varios autores muestran que la falta de inervación catecolaminérgica del ovario modifica, la sensibilidad del ovario a las gonadotropinas, la secreción de esteroides y la ovulación (Chávez y col., 1991; Kawakami y col., 1981; Lara y col., 1990). En nuestro trabajo, los animales jóvenes desnervados por la administración de guanetidina responden con superovulación al estímulo secuencial de PMSG-hCG, resultados que apoyan la idea de que la inervación catecolaminérgica modula de manera inhibitoria la respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas (Chávez y col., 1991; Flores y col., 1990; Kawakami y col., 1981) y que participa en la dinámica del crecimiento folicular y en la selección de aquellos folículos que van a ovular (Dominguez y col., 1991).

En los ovarios de la rata CII-ZV, con EVP, existen folículos grandes sanos y quísticos (datos no mostrados), la histología de estos ovarios es semejante a la descrita en animales con síndrome del ovario poliquístico (Barria

y col., 1993; Lara y col., 1993). En la rata vieja la disminución en la respuesta ovulatoria puede deberse al incremento en la concentración de noradrenalina ovárica (Rosas y col., 1995) tal y como ocurre al inducir el estro vaginal persistente por la administración de valerato de estradiol (Lara y col., 1993)

En las hembras que comienzan a presentar EVP, 12 meses de edad, la capacidad ovulatoria que tienen los folículos ante el estímulo gonadotrópico es menor que en un animal cíclico. Cuando en estos animales viejos se realiza la simpatectomía se induce aumento en la ovulación sólo si son estimulados hormonalmente, sin embargo, esta respuesta es menor a la observada en la hembra desnervada a los tres meses de edad. Estos resultados nos permiten hipotetizar que en la rata de 15 meses de edad con o sin inervación simpática, no se da la ovulación aún cuando se de el estímulo con PMSG-hCG, debido a que en el ovario disminuyó la población de folículos.

La respuesta del ovario depende de la inervación intrínseca y del ambiente hormonal del individuo. Así, la regulación que ejerce la información neural en la rata adulta joven es de tipo estimulante, en la prepúber es de tipo inhibitorio (Flores y col., 1990) semejante a lo que ocurre en la rata vieja.

La inervación catecolaminérgica modula la respuesta del ovario *in vitro* a la hCG, se ha mostrado que en la rata prepúber desnervada por la administración de GTD disminuye la secreción de progesterona y estrógenos en ovarios incubados en presencia de hCG (Lara y col., 1990). Los resultados presentados en este trabajo muestran que la desnervación farmacológica por guanetidina en ratas de 12 meses, con EVP, incrementa las concentraciones plasmáticas de estradiol y disminuye la de progesterona.

Como ya se mencionó, las ratas viejas en EVP comparten características con la hembra que presenta el síndrome del ovario poliquístico, en las que hay

aumento de la concentración plasmática de andrógenos y de la atresia folicular (Barria y col., 1993; Lara y col., 1993). Estas alteraciones han sido utilizadas para explicar la ausencia de ovulación; en nuestro modelo de estudio se observó que en aquellos animales que han presentado EVP por un período mayor a los tres meses, los ovarios se tornan insensibles al estímulo secuencial con PMSG-hCG. Esta respuesta podría deberse a que el ovario de estos animales presenta modificación en el número y/o afinidad de los receptores a la FSH, lo que podría estar disminuyendo la síntesis del complejo enzimático P450_{sec} necesario para la aromatización de los andrógenos. La expresión de los receptores a la FSH puede estar mediada por la información neural que transcurre por las fibras simpáticas (Ferruz y col., 1991).

Los resultados del presente trabajo nos permiten sugerir que los efectos observados en el animal desnervado no se deben solamente a la falta de la información ovárica, ya que la administración subcutánea de guanetidina, disminuye la concentración de catecolaminas en el HMB, región ubicada por fuera de la barrera hematoencefálica, sin que se modificaran en POA-AHA.

En resumen el envejecimiento reproductivo se caracteriza por la pérdida de los ritmos en la secreción de las hormonas esteroideas y de las gonadotropinas. De acuerdo a nuestros resultados podemos proponer el modelo de regulación del eje hipotálamo-hipófisis-ovario en la rata en estro vaginal persistente (Esquema 2). Así, la pérdida de la sincronía en la secreción de las hormonas parece originarse en el ovario y estar modulada por la inervación simpática. Las concentraciones plasmáticas de estrógenos que prevalecen en el animal viejo, producidos por los folículos que han sido estimulados por las concentraciones constantes de la FSH, descensibilizan a las neuronas monoaminérgicas que regulan la secreción de la GnRH, en consecuencia, la hipófisis produciría menor concentración de LH y no se culmina con la ovulación.

CONCLUSIONES

- La rata de la cepa CII-ZV pierde el ciclo estral a partir de los 12 meses de edad y la citología vaginal se caracteriza por presentar estro vaginal persistente.
- En los animales con estro vaginal persistente las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona se mantienen constantes, y son similares a las de un animal ciclico sacrificado en la mañana del estro. Estas concentraciones hormonales pueden ser responsables del incremento en la concentración de noradrenalina y dopamina en POA-AHA .
- En la rata ciclica la inervación simpática modula el proceso ovulatorio de manera estimulante y sensibiliza al folículo al estímulo gonadotrópico.
- La rata vieja es capaz de ovular en respuesta al estímulo gonadotrópico, cuando éste se realiza al inicio de la pérdida del ciclo estral (12 meses de edad). Esta respuesta es amplificada si se elimina farmacológicamente la inervación simpática.
- La hipertrofia que presenta el ovario de la rata vieja, en respuesta al estímulo de PMSG-hCG no depende de la edad, ni de la información neural que recibe la gónada.
- En la rata en EVP la inervación simpática modula de manera inhibitoria la selección de los folículos que van a responder a los estímulos exógenos de gonadotropinas

BIBLIOGRAFIA

- ADAMS C.E. (1982). Envejecimiento y reproducción. En: *Procesos de reproducción en mamíferos*. Tomo 4: Patrones de reproducción, Austin CR y Short RV (Eds.), 1a edición. *La Prensa Médica Mexicana S.A.* México 131-159.
- AGUADO LI, PETROVIC SL, OJEDA SR (1982). Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: Characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 110: 1124-1132.
- AHMED CE, DEES WL, OJEDA SR (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP) containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118: 1682-1689.
- BAHR JM Y BEN-JONATHAN N (1981) Ovarian catecholamines during the prepubertal period and reproductive cycle of several species. En: *Catecholamines Hormones Regulators*, N Ben-Jonathan (Ed), *Raven Press*, New York 279-292.
- BARRACLOUGH CA, WISE PM (1982) The role of catecholamines in the regulation of pituitary luteinizing hormone and follicle stimulating hormone secretion. *Endocr Rev* 3:91-119
- BARRIA A, LEYTON V, OJEDA SR, LARA HE (1993) Ovarian steroidal response to gonadotropins and β -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: Role of Sympathetic innervation. *Endocrinology* 133: 2696-2703
- BLAKE CA, ELIAS KA, HUFFMAN LJ (1983) Ovariectomy of young adult rats has a sparing affect on the suppressed ability of aged rats to release luteinizing hormone. *Biol Reprod* 28: 575-585.
- BRAWER J, SCHIPPER H, ROBAIRE B. (1983) Effects of long term androgen and estradiol exposure on the hypothalamus. *Endocrinology* 112: 194-199.
- BRINK CF, GROB HS (1973) Response of the denervated mouse ovary to exogenous gonadotropins. *Biol of Reprod* 9: 108
- BURDEN HW. (1985) The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: *Catecholamines as hormone regulator*. Nira Ben-Jonathan, Janise M Bahr y Richard Weener (Eds.) *Raven Press*, New York 261-278.
- BUTCHER RL, PAGE RD. (1981). Role of the aging ovary in cessation of reproduction. En: Schwartz NB, Hunzicker-Dunn M. (eds.) *Dynamics of ovarian function*. *Raven Press*, New York 253 - 271.

- CHAPPEL SC, BETHEA CL, SPIES HG (1984) Existence of multiple forms of follicle-stimulating hormone within the anterior pituitaries of cynomolgus monkeys. *Endocrinology* 115 : 452-461.
- CHAVEZ R, CARRIZOSA L, DOMÍNGUEZ R (1991). Effects of superior ovarian nerve on spontaneous and induced ovulation in rats. *Med Sci Res* 19 : 41-42.
- CHAVEZ R, DOMÍNGUEZ R. (1994). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous. *Journal of Endocrinology* 140 : 197-201.
- DOMÍNGUEZ R, CHÁVEZ R, CRUZ ME (1991) La regulación del crecimiento y el desarrollo folicular. En: *Temas selectos de biología de la reproducción*. R. Domínguez (Ed.) Porrúa-UNAM, México 163-188
- DYER CA, ERICKSON GF (1985) Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* 116 : 1645-1652
- CLEMENS JS, MEITES J (1971) Neuroendocrine status of old constant estrous rats. *Neuroendocrinology* 7 : 249-256
- COLLINS TJ, PARKENING TA, SMITH ER. (1980) Plasma and pituitary concentrations of LH, FSH and prolactin in aged superovulated C57BL/6, CD-1 and B6D2F1 mice. *Exp. Gerontol* 15 : 209-216
- CURRY TE Jr., LAWRENCE IE Jr., BURDEN HW (1984) Ovarian sympathectomy in the guinea pig. II Effects on follicular development during the prepuberal period and following exogenous gonadotropin stimulation. *Cell Tissue Research*, 236: 593-596.
- DEMAREST KT, REIGLE GD, MOORE KE (1980) Characteristics of dopaminergic neurons in the aged male rats. *Neuroendocrinology* 31 : 222-227
- DePAOLO LV, CHAPPEL SC (1986) Alterations in the secretion and production of follicle-stimulating hormone precede age-related lengthening of estrous cycles in rats. *Endocrinology* 118 : 1127-1133.
- ERICKSON GF, HSUEH AJW, LU JKH (1979). En: *Role of the aging ovary in cessation of reproduction*. Schwartz NB, Hunzicker-Dunn M. eds. *Dynamics of ovarian function*. Raven Press, New York 253 :271.

- ESTES KS, SIMPKINS JW (1984). Age-related alteration in catecholamine activity within microdissected brain regions of ovariectomized Fischer 344 rats. *J. Neurosci. Res* 11:405-417.
- FEDER H.H. (1981). Estrous cyclicity in mammals. En: *Neuroendocrinology of Reproduction Physiology and Behavior, Capitulo 10*. Norman T Adler (Ed.) *Plenum Press*. New York, 279-333.
- FERRUZ J, BARRIA A, GALLEGUILLOS X, LARA HE. (1991). Release of norepinephrine from the rat ovary: Local modulation by gonadotropins. *Biol Reprod* 45: 592-597.
- FINCH CE. (1993) Biochemistry of aging in the mammalian brain. En: *Basic neurochemistry*. Capitulo 30, George J. Siegel (Ed). *Raven Press*, New York, 627-644.
- FLORES A, AYALA ME, DOMÍNGUEZ R (1990) Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the pubertal and the adult rat? *Med Sci Res* 18 : 817-818
- GEE DM, FLURKEY K, FINCH CE (1983) Aging and the regulation of luteinizing hormone in C57BL/6J mice: Impaired elevations after ovariectomy and spontaneous elevations at advanced ages *Biol Reprod* 28 : 598-607.
- HADFIELD HG, CRANE ME, NUGET EA, MILIO C , NARESHIMASCHARI N (1985) Determination of 13 catecholamines, indolamines, metabolites and precursors in less than 20 minutes during a simple HPLC run *J Liq. Chrom* 8: 89-97.
- HARMAN SM, TALBERT GB (1970) the effect of maternal age on ovulation, copora luteo of pregnancy, and implantacion failure in mice *J Reprod Fertil* 23 : 33-39.
- HUANG HH, STEGER RW, BRUNI JF, MEITES J. (1978) Patterns of sex steroid and gonadotropin secretion in aging female rats *Endocrinology* 103 : 1855-1859.
- JORDAN AW. (1981). Changes in ovarian β -adrenergic receptors during the estrous cycle of the rat. *Biol Reprod* 24 : 245-248.
- KAWAKAMI M, KUBO K, UEMURA T, NAGASE M, HAYASHI R. (1981). Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. *Endocrinology* 109:136-145.
- KORDON C, DROUVA SV, MARTINEZ DE LA ESCALERA G, WEINWE RI. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The physiology of reproduction*. Capitulo 27, 2a. De. Ernest Knobil y Jimmy de Neil (Eds.). Raven Press, New York 1213-1314.

- KROHN PL . (1962) . Review lectures on senescence. II. Heterochronic transplantation in the study of aging. *Proc R Soc Lond (Ser B)* 1962 : 128-147.
- KUSHIMA K, KAMIO K, OKUDA Y. (1961) Climaterium, climacteric disturbances and rejuvenation of sex center. *Tohoku J Exp Med* 74 : 113-129.
- LARA HE, McDONALD JK, AHMED CE, OJEDA SR (1990) Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127 :2199-2209.
- LARA HE, FERRUZ JL, LUZA S, BUSTAMANTE DA, BORGES Y, OJEDA SR (1993). Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. *Endocrinology* 133 : 2690-2695.
- LAWRENCE IE Jr., BURDEN HW. (1980) The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The anatomical Record* 196 : 51-59.
- LU JHK. (1983) Changes in ovarian function and gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats. En : Neuroendocrinology of aging, Meites J (Ed) *Plenum Press*, New York 103-122.
- LU JKH, GILMAN DP, MELDRUM DR, JUDD HL, SAWYER CH (1981a) Relationship between circulating estrogens and the central mechanism by which ovarian steroids stimulate luteinizing hormone secretion in aged and young female rats. *Endocrinology* 108 :836-841
- LU JKH, HOPPER BR, VARGO TM, YEN SSC (1979) Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretion in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol Reprod* 21 : 193-203.
- LU JKH, KLEDZIK GS. (1981b) Chronological changes in ovarian function and morphology in aging rats and their relation to neuroendocrine responses. En Dynamics of ovarian function, NB Schwartz y M Hunzicker (Eds) *Raven Press*, New York 291-297.
- MALAMED S, GIBNEY JA, OJEDA SR. (1992) Ovarian innervation develops before folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Res* 270 : 87-93.
- MATT DW, DAHL KD, SARKISSIAN A, SAYLES TE (1993) Apparent absence of negative feedback in middle-aged persistent-estrous rats following luteinizing hormone-releasing hormone agonist treatment : relation to plasma inhibin and 17 β -Estradiol. *Biol Reprod* 48 : 333-339.
- MILLER AE, RIEGLE GD (1980) Temporal changes in serum progesterone in aging female rats. *Endocrinology* 106 : 1579-1583.

- MONTES G.S. y LUQUE E.H. (1988). Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat* 133 : 192-199.
- NAFTOLIN F, RYAN KJ, DAVIES IJ. (1976). Androgen aromatization by neuroendocrine tissues. En : Subcellular mechanisms in reproductive neuroendocrinology, Naftolin F, Ryan KJ y Davies IJ (Eds). *Elsevier, Amsterdam* 347.
- NASS TE, LaPOLT PS, JUDD HL, LU JKH (1984). Alterations in ovarian steroid and gonadotrophin secretion preceding the cessation of regular oestrous cycles in aging female rats. *J Endocrinol* 100 : 43-50
- NELSON J.F, FELICIO L.S. (1985) Reproductive aging in the female: An etiological perspective. *Rev Biol Res Aging* 2 : 251-314.
- NOVAK ER. Ovulation after 50. *Obstet Gynecol* 36 : 903-910.
- PAXINOS G, WATSON C (1982) The rat brain in stereotaxic coordinates. *Academic Press Inc*, New York. pp 13
- PELUSO JJ, STEGER RW, HAFEZ ESE. (1977) *Biol Reprod* 16 : 212-215.
- PENG MT, HUANG HH (1972) Aging of hypothalamic-pituitary-ovarian function in the rat. *Fertil Steril*, 23 : 535-542.
- RANCE NAOMI, PHYLLIS MW, SELMANOFF MK, BARRACLOUGH CA (1981). Catecholamine turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrus day 1. *Endocrinology* 108:1795-1802.
- ROGERS J, BLOOM FE. (1985) Neurotransmitters, metabolism and function in the aging central nervous system. En : Handbook of the Biology of Aging, Segunda edición, Finch CE, Schneider EL (Eds), *Van Nostrand*, New York 645-691.
- ROSAS P, CHÁVEZ R, DOMÍNGUEZ R. (1995) Ovulation and norepinephrine (NE) ovarian levels in adult and aged rats with pharmacological denervation. 25 th Annual meeting of the Society for Neuroscience. 237. 14
- SHORT R.V. (1982). Papel de las hormonas en los ciclos sexuales. En : Procesos de reproducción en mamíferos. Tomo 3 : Hormonas en la reproducción, Austin CR y Short RV (Eds.). *La Prensa Médica Mexicana S.A.* México, 41-71.

- SILVERMAN AJ, LIVNE Y, WITKIN J. (1994). The gonadotropin releasing hormone (GnRH), neuronal systems: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: The physiology of reproduction. Capitulo 28, 2a De. Ernst Knobil y Jimmy D. Neil (Eds.). Raven Press, New York 1711-1746.
- SIMPKINS JW (1984). Regional changes in monoamine metabolism in the aging constant estrous rats. *Neurobiol. Aging* 5 : 309-313.
- SIMPKINS JW, MULLER GP, HUANG HHI, MEITES J (1977). Evidence of depressed catecholamine and enhanced serotonin metabolism in aging male rats. Possible relation to gonadotropin serotonin. *Endocrinology* 100 : 1672-1678.
- SMITH WA, COOPER RL, CONN PM. (1982). Altered pituitary responsiveness to gonadotropin-releasing hormone in middle-aged rats with 4-day estrous cycles. *Endocrinology* 111 : 1843-1848.
- TALBERT GB (1971) Effect of maternal age on postimplantation reproductive failure in mice. *J Reprod Fertil* 24: 449-452.
- TALBERT GB (1968) *Am J Obstet Gynecol* 102: 451-477.
- VOM SAAL S, FINCH CE, NELSON JF. (1994). Natural history and mechanisms of reproductive aging in humans, laboratory rodents, and other selected vertebrates. En: The physiology of reproduction. Capitulo 61, 2a. Ed. Ernst Knobil y Jimmy D. Neil (Eds.). Raven Press, New York, 1213-1314.
- WEILAND NG, COHEN IR, WISE PM (1989). Age-associated alterations in catecholamines concentrations, neuronal activity, and $\alpha 1$ receptor densities in female rats. *Neurobiol of aging* 10: 323-329.
- WISE PM, KRAJNAK KM, KASHON ML. (1996). Menopause: The aging of multiple pacemakers. *Science* 273 : 67-70
- WRUTNIAK-ZOLNOWSKA T. (1980). Changes of the secretory activity of ovarian chromaffin cells during the sex cycle of female white rats. *Endokrinologic*. 76 : 279-287.

APÉNDICE

Cuantificación de monoaminas en el hipotálamo por HPLC

Obtención de muestras

A los animales sacrificados se les disecó rápidamente el cerebro, que se colocó en una solución helada de suero fisiológico. El cerebro se endureció por congelamiento con nitrógeno líquido. Por medio de un sistema de navajas paralelas se realizaron los cortes de tejido cerebral, con base al atlas del cerebro de rata de Paxinos y Watson (1982). El área preóptica hipotalámica anterior comprende entre los 6.7 mm y 7.7 mm tomando como punto de referencia la línea interaural. Como señales de la ubicación correcta del corte se usó la presencia de los cuerpos mamilares. El hipotálamo medio comprende entre 5.7 mm y 6.7 mm interaural. Como señales de la ubicación correcta del corte se usó la presencia del fascículo mamilotalámico (fig. 1). De estos cortes, con ayuda de un sacabocados (1 mm de diámetro interno) se disecaron las porciones izquierda y derecha de cada área y las muestras se guardaron en papel aluminio a -70 °C hasta el momento de la cuantificación de monoaminas por HPLC.

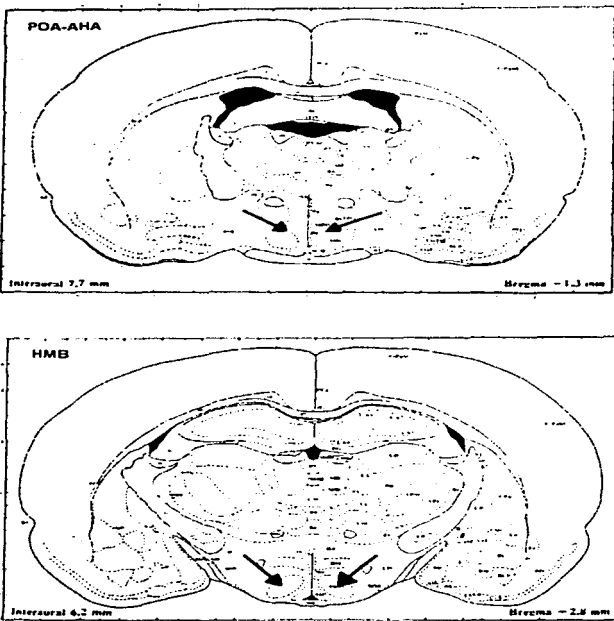


Fig. 1. Localización de POA-AHA e HMB (señalados por las flechas) en un corte coronal del cerebro de la rata (Tomados del Atlas de Paxinos y Watson, 1982).

Cuantificación de monoaminas

La cuantificación de monoaminas se realizó con la ayuda de un equipo de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC por sus siglas en inglés) acoplado a un detector electroquímico (HPLC-ED). El equipo utilizado está compuesto de una bomba isocrática digital (L-250 model Perkin Elmer Co., Norwalk, CT, USA) con una válvula de inyección de seis puertos (Rheodyne 7125 model, Cotati, CA, USA) con un loop de 20 μ l. Se usó una columna de fase reversa C18 (Perkin Elmer Co.) de 250 x 4.6 mm rellena con partículas de Pecosil de 10 μ m. Un detector amperométrico (LC-4C, Bioanalytical systems Inc.) con un electrodo de trabajo de carbón vidriado ajustado a un potencial de 0.85V versus un electrodo de referencia de plata-cloruro de plata (Ag/AgCl). Para asegurar la máxima sensibilidad del sistema, el electrodo de carbón vidriado fue pulido cuando se consideró conveniente. La ganancia del detector se ajustó a 2.0 nA y el filtro a 0.1 Hz. Los datos fueron colectados y analizados por una computadora (Model 1020 software, Perkin Elmer) (Fig. 2) .

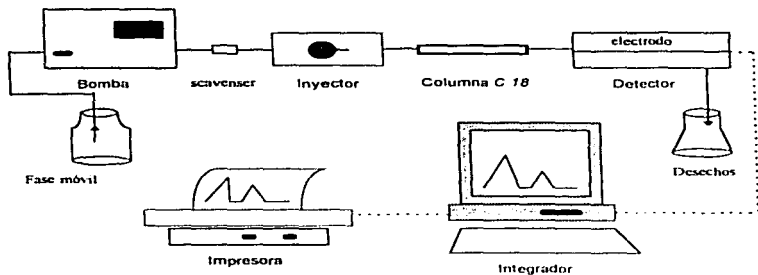


Fig. 2. Equipo de HPLC

Fase móvil

A partir de agua ultrapura ($>10M\Omega$), se preparó una solución tampón de citratos (Merck-México, SA., Art.244) 0.15M, el pH se ajustó a pH=3.0 con solución saturada de hidróxido de sodio, y se adicionó 0.46 mM de detergente (1-octane-sulfonic acid, Sigma Chemical Co. USA O-8380). El buffer se filtró a través de una membrana con poro de $0.22\mu m$ (Millipore, Bedford, MA, USA) y se desgasificó por vacío durante 30 minutos. Finalmente se adicionaron los compuestos orgánicos (4% Acetonitrilo y 2% Tetrahydrofurano para cromatografía, E. Merck, Darmstadt, F.R. Germany).

Preparación de estándares

Las soluciones madre de cada uno de los compuestos a analizar noradrenalina ((-)-Artenerol free base), MHPG (4-Hidroxi-3-Metoxifenil Glicol), dopamina (3-Hidroxi-tiramina hidrociorada), DOPAC (Acido 3-4-Dihidroxi-fenilacético), serotonina (5-Hidroxitriptamina) y 5-HIAA (Acido 5-Hidroxiindol-3-acético). Todas las sustancias fueron adquiridas a Sigma Chemical Co. (St. Louis, Mo, USA).

Calibración del equipo

El equipo se calibró con el método de estándar externo, usando el área de los picos obtenidos en el cromatograma (Fig. 3) de tres puntos de calibración (2, 1 y 0.5 ng) y ajustando una curva lineal que incluye al origen por la regresión de mínimos cuadrados. Los valores de correlación obtenidos fueron al menos de 0.95 para cada una de las sustancias (Fig. 4).

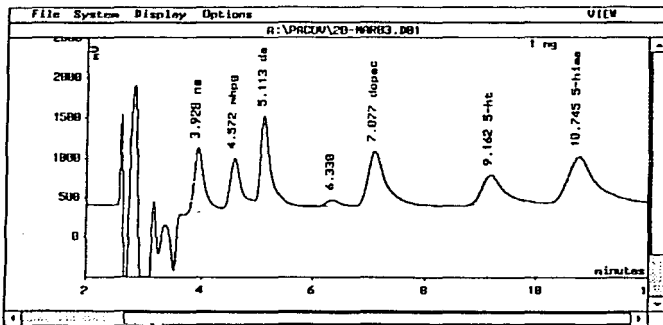


Fig. 3. Cromatograma de un estándar con una concentración de 1 ng donde aparecen los tiempo de retención para cada neurotransmisor.

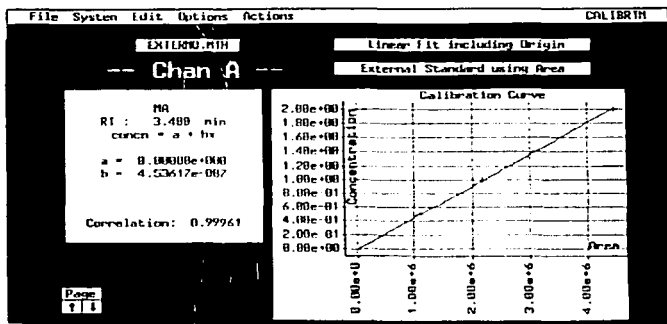


Fig. 4. Calibración del método por regresión lineal incluyendo el origen para noradrenalina en el integrador Model 1020 software de Perkin Elmer.

Cuantificación de 17 β -estradiol y progesterona por RIA de Fase sólida.

La cuantificación de 17 β -estradiol o progesterona se realizó por radio inmuno análisis (RIA) de fase sólida, con un kit Coat-A-Count y utilizando al ¹²⁵ I como marca.

Obtención de muestras

Los animales fueron sacrificados por decapitación; la sangre colectada se dejó coagular por 30 minutos y se obtuvo el suero por centrifugación a 3500 rpm, el cual se almacenó a -20 °C hasta la cuantificación de las hormonas.

Cuantificación de estradiol y progesterona

El Kit para la determinación de éstas hormonas cuenta con tubos en los que se encuentra presente un anticuerpo altamente específico para estradiol o progesterona con baja reactividad de cruzamiento para otros componentes. La hormona marcada con ¹²⁵ I compite con la hormona de la muestra (hormona fría) por los sitios de unión al anticuerpo, la mezcla se incuba por 3 horas a temperatura ambiente o bien por 1 hora a 37 °C ; después de la incubación se decanta todo el líquido. El tubo se coloca en un contador gama modelo cobra 5005, Packard TM, en donde se determina la concentración de las hormonas en función de las cuentas por minuto. La cantidad de radioactividad presente en el tubo es inversamente proporcional a la cantidad de hormona.. La concentración plasmática de la hormona se determina en función de la curva de calibración.

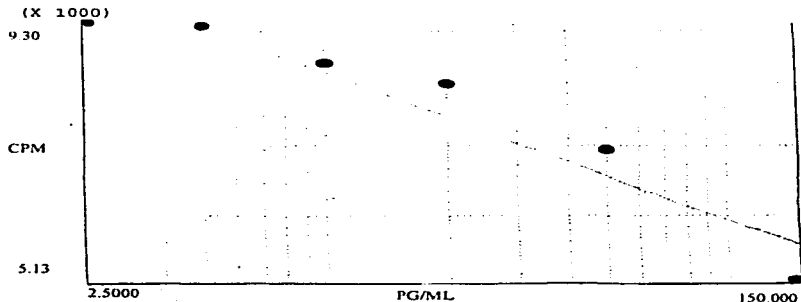
Curva de calibración

La curva de calibración para 17β -estradiol se obtuvo utilizando estándares de suero humano, incluidos en el kit, de 2.5, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0 y 150 pg ajustando una curva semilogarítmica contra el valor obtenido de cuentas por minuto. El coeficiente de correlación fue de 0.9545 y el límite de detección 2.500 pg (Fig. 5).

La de progesterona se elaboró utilizando estándares de 0.1, 0.5, 2.0, 10.0, 20.0, y 40.0 ng ajustando de la misma manera que para estradiol. El coeficiente de correlación fue de 0.9870 y el límite de detección de 0.1000 ng (Fig. 6).

27 Jan 97 09:96 Packard Instrument Company
Protocol # : 3 E2
WARNING: CURRENT CURVE FAILS TEMPLATE CRITERIA
Assay Type : RIA CPM

BOUND

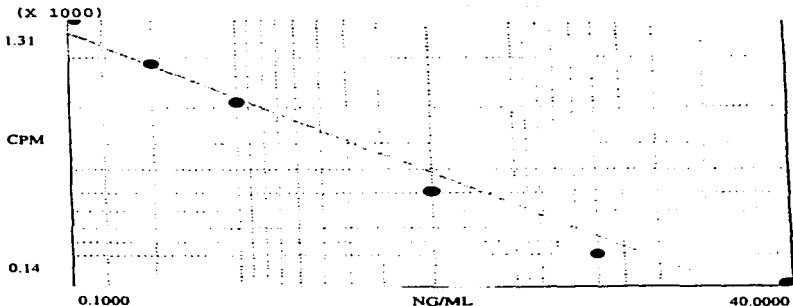


STD #	CPM	DEFINED DOSE	% B/F	CALC. DOSE	% DIFF
2	9303	2.50000		4.13854	65.54
3	9149	5.00000		4.75763	-4.85
4	8501	10.00000		8.59683	-14.03
5	8137	20.00000		12.07056	-39.65
6	7106	50.00000		32.65970	-34.68
7	5131	150.00000		280.98660	67.32

Curve fit	: LOGIT	Transform : LOG	Transform Y	: LOGIT
Corr. Coef.	: 0.9545		Slope	: -0.4886
Det. Limit.	: 2.5000		Para. Coef	
% NSB/Total			%Ref/Total	: 43.819
ED20	: OFF CURVE	ED 50 : OFF CURVE	ced 80	: OFF CURVE
%Digma Std.	: 3.0176			
Intercept	: 0.52880			

Fig. 5 Curva de calibración para estradiol

27 Jan 97 09:26 Packard Instrument Company
 Protocol # : 3 P4
 WARNING: CURRENT CURVE FAILS TEMPLATE CRITERIA
 Assay Type : RIA CPM BOUND



STD #	CPM	DEFINED DOSE	% B/F	CALC. DOSE	% DIFF
2	13112	0.10000		0.16587	65.87
3	10590	0.50000		0.34182	-31.64
4	6694	2.00000		0.31494	-34.25
5	3141	10.00000		9.02056	-9.79
6	2200	20.00000		21.00455	5.02
7	1432	40.00000		56.63426	41.59

Curve fit : LOGIT
 Corr. Coef. : 0.9870
 Det. Limit. : 0.1000
 % NSB/Total :
 ED20 : 1.3271
 %Digma Std. : 2.4311
 Intercept : -1.2567

Transform : LOG

ED 50 : OFF CURVE

Transform Y : LOGIT
 Slope : -1.0541
 Para. Coef. : 0.9757
 %Ref/Total : 39.310
 ED80 : OFF CURVE

Fig. 6. Curva de calibración para progesterona