

2ej



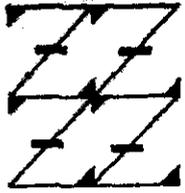
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

CAMBIOS EN LA MADURACION Y CRECIMIENTO DEL FOLICULO OVARICO, SECRECION DE GONADOTROPINAS ESTEROIDES OVARICOS Y MONOAMINAS HIPOTALAMICAS DURANTE EL DESARROLLO PREPUBERAL DE LA RATA

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
MARTA ELENA CASTRO MANREZA

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES
DE NUESTRA REFLEXIÓN

DIRECTORA: DRA. MARIA ELENA AYALA ESCOBAR

MEXICO, D. F.

1999.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

271036



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

"ZARAGOZA"

**CAMBIOS EN LA MADURACIÓN Y CRECIMIENTO DEL FOLÍCULO OVÁRICO,
SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS, ESTEROIDES OVÁRICOS Y MONOAMINAS
HIPOTALÁMICAS DURANTE EL DESARROLLO PREPUBERAL DE LA RATA.**

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: Marta Elena Castro Manreza

Directora de tesis. Dra. María Elena Ayala Escobar

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

**Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA clave
IN208796, el Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) y el programa de
Becas para Tesis de Licenciatura en Proyectos de Investigación de la UNAM.**

Dedicatorias

A mis padres, Lucía y Teodoro, por regalarme su confianza,

No olviden que son mi principal motivo de superación.

A mis hermanos Javier y Oscar, porque siempre puedo contar con ellos

A mis amigos Javier, Nacho y Vicky, porque juntos compartimos sueños.

Agradecimientos

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su acertada dirección y ayuda brindada en la elaboración de esta tesis.

Al Dr. Roberto Domínguez Casala por permitirme colaborar en su grupo de trabajo.

A los miembros del jurado:

**Dra. María Elena Ayala Escobar
Dra. Leticia Morales Ledesma
Dra. Patricia Rosas Saucedo
M. en C. Carlos Bautista Reyes
M. C. Raúl Zavala Chavero**

Por sus valiosas sugerencias para la realización de este trabajo.

Muy especialmente, a Juanita por su amistad y apoyo que me ha brindado en todo momento.

A María de Jesus, Sonia y la Técnico María Luisa por su contribución para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, que hacen posible que en este laboratorio exista un ambiente de trabajo agradable.

ÍNDICE

Resumen	I
Introducción	1
Eje hipotálamo-hipófisis y sistemas de neurotransmisión	3
Estructura y funciones del ovario	10
Atresia folicular	14
Biosíntesis de los esteroides ováricos	16
Control hormonal de la atresia folicular	20
Pubertad	21
Sistemas de neurotransmisión y regulación de la secreción de las gonadotropinas.....	26
Planteamiento del problema	31
Hipótesis	32
Objetivos	32
Materiales y Métodos	33
Resultados	37
Discusión	59
Conclusiones	78
Bibliografía	79
Apéndice	88

RESUMEN

Se ha descrito que el sistema noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico participan en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el inicio de la pubertad, debido a que modulan la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y por ende de las gonadotropinas. Estas hormonas al actuar en el ovario regulan la secreción de las hormonas ováricas y el crecimiento y maduración del folículo ovárico, sin embargo durante el desarrollo prepuberal de la rata existe poca información al respecto. Por ello, el objetivo del presente trabajo fue analizar los cambios en el crecimiento y maduración del folículo ovárico, en la concentración sérica de hormonas ováricas (Progesterona y 17β -estradiol), de la hormona luteinizante y en la actividad del sistema noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico en el hipotálamo anterior (HA), medio (HM) y posterior (HP), durante el desarrollo prepuberal de la rata. Así mismo, analizar si existe vinculación entre los eventos antes mencionados. Para lo cual, se utilizaron ratas de 10, 12, 14, 16, 18, 21, 24, 26, 28, 30, 32, 34, 35 y 38 días de edad, sacrificadas a las 14:00 horas.

Se observó que durante el desarrollo prepuberal de la rata se presentan ondas de desarrollo y atresia folicular. En el ovario de animales sacrificados entre los 10 y 16 días de edad predominan los folículos pequeños ($>350 \mu\text{m}$ de diámetro), mientras que a los 18 días ya se observan los folículos medianos ($350\text{-}499 \mu\text{m}$ de diámetro) y los folículos preovulatorios a partir de los 21 días de vida. La incidencia de atresia en los folículos pequeños es mayor a los 12 y 14 días y en los folículos medianos a los 24, 28 y 38 días.

La concentración de LH es alta durante la etapa infantil, en las siguientes edades disminuye y aumenta en los días cercanos a la pubertad. La concentración de progesterona permanece baja durante la mayor parte del desarrollo del animal y únicamente aumenta en los días previos a la pubertad (35 y 38 días). Mientras que, la concentración de estrógenos en suero aumenta a medida que avanza el desarrollo de la rata, este evento es más evidente a los 38 días de edad. La mayor concentración de 17β -estradiol en suero coincide con un mayor

desarrollo del folículo ovárico observado en los días previos a la pubertad.

En el hipotálamo anterior y medio se presentan cuatro picos de actividad del sistema noradrenérgico (a los 12-14, 21, 28 y 32 días de edad) y la actividad de este sistema disminuye a medida que aumenta el desarrollo del animal. En cambio, la actividad de la neurona dopaminérgica en el hipotálamo anterior y medio es baja en la mayoría de las edades estudiadas, mientras que en el hipotálamo posterior aumenta al inicio de la etapa infantil y disminuye progresivamente a medida que avanza el desarrollo del animal. En el HA y HM la actividad de la neurona serotoninérgica permanece alta durante todo el desarrollo prepuberal del animal, mientras que en hipotálamo posterior es alta en la etapa infantil pero en las siguientes edades disminuye.

Con base en estos resultados es posible sugerir que durante el desarrollo prepuberal de la rata se presentan ondas de desarrollo y atresia folicular, lo cual se relaciona con los cambios en la secreción de estrógenos por el ovario y de la LH. Así mismo, se observa que la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión cambia durante el desarrollo del animal, este evento posiblemente este vinculado a la maduración de los mecanismos neuroendócrinos que modulan la secreción de las gonadotropinas y que inducen el inicio de la pubertad.

INTRODUCCIÓN

El sistema reproductor de la hembra está formado por los ovarios, las trompas uterinas (oviductos), el útero, la vagina y los genitales externos. El ovario tiene dos funciones que se interrelacionan y que permiten la perpetuación de las especies; la producción de gametos (óvulos viables) y la síntesis de hormonas ováricas (estrógenos, progesterona, andrógenos, inhibina y activina) (Domínguez y col., 1991; Ross y col., 1992).

Los mecanismos que regulan las funciones del ovario dependen de la interacción de un conjunto de procesos neuroendócrinos que involucran al hipotálamo, la glándula hipofisiaria y el ovario (Fink 1988; Domínguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994). El lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis) secreta varias hormonas, entre ellas están la hormona foliculo estimulante (FSH), la hormona luteinizante (LH) y la prolactina (PRL), denominadas gonadotropinas (Genuth 1993).

La FSH y la LH regulan varios de los procesos relacionados con las funciones del ovario, a su vez su secreción es modulada por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y por las hormonas secretadas por el propio ovario. La GnRH es transportada desde el hipotálamo por un sistema de vasos sanguíneos denominado sistema porta-hipotalámico-hipofisiario y llega a la adenohipófisis donde estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas por los gonadotropos (Feder 1981; Fink 1988; Ojeda y Urbanski, 1994). (Fig. 1). Así mismo, la secreción de la GnRH es regulada por diferentes sistemas de neurotransmisión, entre los que se encuentran el sistema noradrenérgico, dopaminérgico, serotoninérgico, por los aminoácidos excitadores como el aspartato, glutamato y la glicina, los péptidos como el neuropéptido Y (NPY), el péptido YY (PYY) y el ácido γ -aminobutírico (GABA) (Kordon y col., 1994).

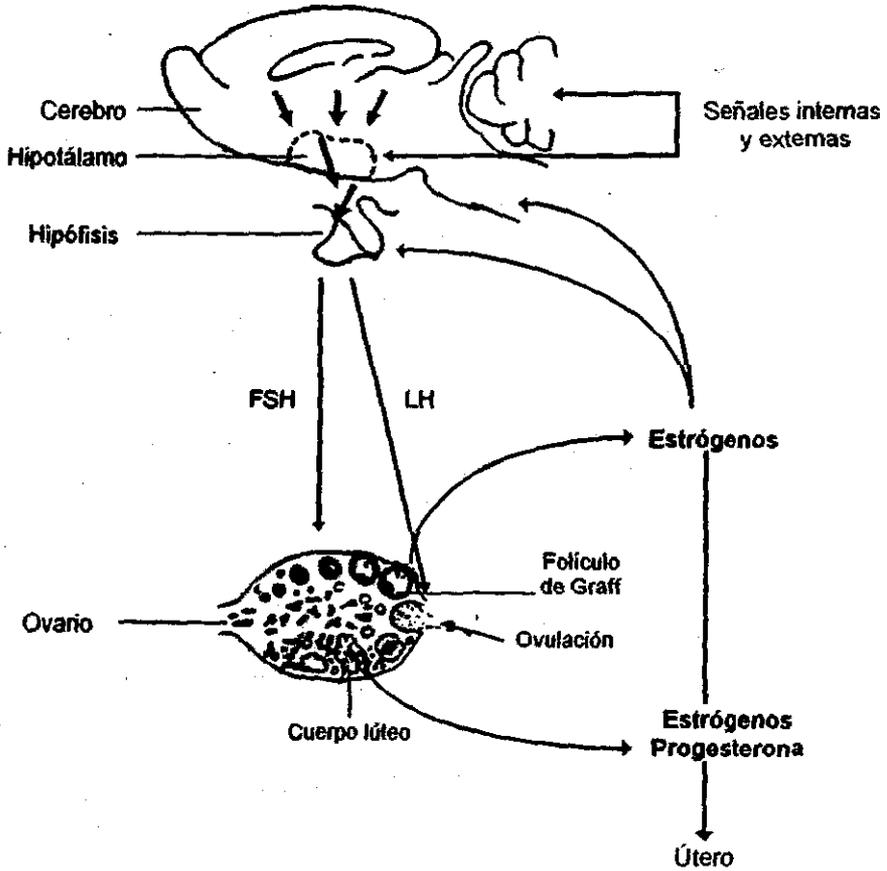


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Diagrama del control del ciclo ovárico por la hormona foliculo estimulante (FSH) y la hormona luteinizante (LH) que son secretadas por la adenohipófisis. La síntesis y liberación de la FSH y la LH es regulada por el hipotálamo vía la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). A su vez, la secreción de este decapeptido es modulada por señales internas y externas, una de las señales es el mecanismo de retroalimentación positivo y negativo que ejercen los estrógenos y la progesterona producidas por el propio ovario (Tomado de Fink, 1988).

Eje Hipotálamo-hipófisis y sistemas de neurotransmisión.

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo y se encuentra unido a la hipófisis por el tallo hipofisario, está delimitado de la región anterior a la caudal por el quiasma óptico y los cuerpos mamilares respectivamente y en la región lateral por los surcos hipotalámicos laterales (Brown 1994). En el hipotálamo, se localizan grupos de neuronas que constituyen los núcleos hipotalámicos y tomando como referencia la distribución de estos, dicha estructura se puede dividir en anterior, medio y posterior. El hipotálamo anterior se encuentra conformado por el área preóptica anterior y media, los núcleos hipotalámicos periventricular, paraventricular y supraquiasmático (Simerly 1995). En el hipotálamo medio se localiza el núcleo ventromedial, dorsomedial, arcuato, supraóptico y retroquiasmático, así como la eminencia media. En el hipotálamo posterior se ubica el núcleo premamilar dorsal, premamilar ventral, posterior y tuberal magnocelular (Simerly 1995; Parent 1979) (Apéndice B, Fig. 28).

El hipotálamo cumple diversas funciones encaminadas al mantenimiento del medio interno, y también secreta diversos péptidos que actúan localmente o son liberados a la circulación y ejercen su acción en órganos distantes, como la hipófisis. Entre los péptidos que sintetiza se encuentra el GnRH, que es producido en los diferentes núcleos hipotalámicos y otras estructuras extrahipotalámicas. En el hipotálamo los somas de las neuronas que producen el GnRH (GnRHérgicas), se encuentran en el área hipotalámica anterior, el núcleo arcuato, el hipotálamo medio basal. Este péptido se libera al sistema de vasos localizado en la eminencia media (Fink 1986; 1988).

En la rata la mayoría de las fibras de las neuronas GnRHérgicas se proyectan desde el área preóptica y las áreas cercanas hasta la eminencia media, conformando el haz septo-preóptico-infundibular. Algunas de estas fibras también se dirigen al órgano vascular de la lamina terminal (OVLT), a la misma área preóptica (donde terminan en la vecindad de los somas GnRHérgicas), a los cuerpos mamilares y el área tegmental ventral (Hoffman y col., 1986; Jean-Louis y col., 1991). En estructuras extrahipotalámicas como el lóbulo olfatorio y

en la sustancia gris mesencefálica se ha identificado a la GnRH, sin embargo la mayor proporción (aproximadamente el 70 %) de los somas productores del péptido se localizan en el hipotálamo anterior y medio (Jean-Louis y col., 1991).

La GnRH es un decapeptido constituido por la siguiente secuencia de aminoácidos Piroglu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH₂, cuya estructura es idéntica en la mayoría de los mamíferos (Fink 1986; Bousfield y col., 1994; Ulloa-Aguirre 1991). La FSH y la LH son dos hormonas glucoproteicas sintetizadas por los gonadotropos del lóbulo anterior de la hipófisis (adenohipófisis), la primera hormona estimula el crecimiento y la síntesis de los estrógenos por el folículo ovárico, mientras que la segunda induce la síntesis de los andrógenos y la ruptura del folículo preovulatorio (ovulación).

Ambas gonadotropinas están constituidas por dos cadenas de polipéptidos glucosilados (α y β) unidas en forma no covalente. La estructura de la cadena α es común para ambas gonadotropinas, sin embargo la cadena β es única para cada hormona y le confiere la especificidad biológica (Bousfield y col., 1994; Lawson y Stevens 1980 citado en Ulloa-Aguirre 1991). Las dos cadenas poseen unidades de carbohidratos (manosa, N-acetilglucosamina, galactosa y fructosa) y de ácido siálico (Bousfield y col., 1994; Ulloa-Aguirre 1991), estos residuos son los que le confieren sus propiedades fisicoquímicas (peso molecular y punto isoelectrico) y fisiológicas (actividad biológica y la capacidad de unión a su receptor membranal).

Existen diferentes isoformas de la FSH, cada una de las cuales difiere entre si, y se han identificado seis formas moleculares de acuerdo a su punto isoelectrico, que van de 6.0 a 3.8. Así mismo, la capacidad de unión al receptor y la actividad biológica de las isohormonas de la FSH varía dependiendo del punto isoelectrico. Por medio de estudios *in vitro* se ha mostrado que entre más ácido es el punto isoelectrico de la isohormona, disminuye la capacidad de unión al receptor y la actividad biológica, mientras que las formas básicas tienen mayor capacidad de unión a su receptor y actividad biológica (Ulloa-Aguirre 1991).

En la rata hembra inmadura de 5 a 29 días de edad, predominan las formas más ácidas y durante la pubertad aumenta la producción de formas básicas (Neill 1974 citado en Ulloa-Aguirre 1991).

En el hipotálamo existen dos centros que regulan la secreción de las gonadotropinas, el centro tónico localizado en el hipotálamo medio basal (núcleo arcuato y eminencia media) que mantiene la secreción basal de ambas hormonas y el centro cíclico que comprende a las neuronas GnRHérgicas que se localizan en el área preóptica y el núcleo supraquiasmático y son las responsables de modular en la rata adulta la secreción "cíclica" de las gonadotropinas en la tarde del proestro (Fink, 1986, 1988; Brown, 1994).

Los estudios anatómicos han mostrado que la neurona GnRHérgica recibe inervación de los diferentes sistemas de neurotransmisión, como el noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico entre otros y cuyos somas se localizan en estructuras hipotalámicas o extrahipotalámicas (Fink, 1986; Brown, 1994; Ojeda y Urbanski, 1994).

Se señala que la secreción de la GnRH es modulada por las hormonas ováricas, sin embargo se sabe que las neuronas productoras del péptido carecen de receptores a los estrógenos, por lo que se sugiere que estas hormonas modulan la secreción de la GnRH vía los diferentes sistemas de neurotransmisión (Fink, 1986, 1988; Ojeda y Urbanski 1994). Así mismo, la actividad de estos sistemas es regulada a su vez por las hormonas esteroides ováricas (Fink, 1988 y Brown, 1994).

Los cuerpos celulares de las neuronas noradrenérgicas están situados en la médula oblonga, en el cerebro medio, posterior y en el área de la formación reticular y se denominan desde A1 hasta A7 (Fink 1986; Weiner y Molinoff, 1993; Brown 1994; Kordon y col., 1994). Las principales fibras noradrenérgicas nacen en dos sitios y se dividen en dos rutas principales la vía dorsal y la ventral. Los cuerpos celulares que dan origen a la vía dorsal se encuentran en el locus coeruleus, la cual envía sus terminaciones a la médula espinal, al cerebelo, corteza cerebral y el hipocampo. Los cuerpos celulares que constituyen la vía ventral se localizan en

el área tegmental lateral, y dan origen a fibras nerviosas que inervan el cerebro medio, el hipocampo y diferentes núcleos hipotálamicos que incluyen al dorsomedial, periventricular, arcuato, paraventricular, supraóptico, área hipotálamica anterior, área retroquiasmática y la capa interna de la eminencia media (Müller y Nistico 1989; Weiner y Molinoff, 1993; Brown 1994) (Fig. 2).

Los estudios de inmunocitoquímica y autoradiografía han permitido establecer que en el área preóptica, en la banda diagonal de Broca y alrededor de la lamina terminal del órgano vasculoso, las terminales nerviosas que contienen noradrenalina (NA), están en contacto sináptico con los cuerpos celulares GnRHérgicos (Fryer, 1980; Jennes y col., 1982; Nakai y col., 1986). Además, se ha mostrado que el papel que juega este neurotransmisor en los mecanismos que regulan la secreción de la FSH y la LH es de tipo estimulatorio y que la actividad del sistema noradrenérgico a su vez es regulada por los esteroides ováricos (Fink, 1988; Brown, 1994).

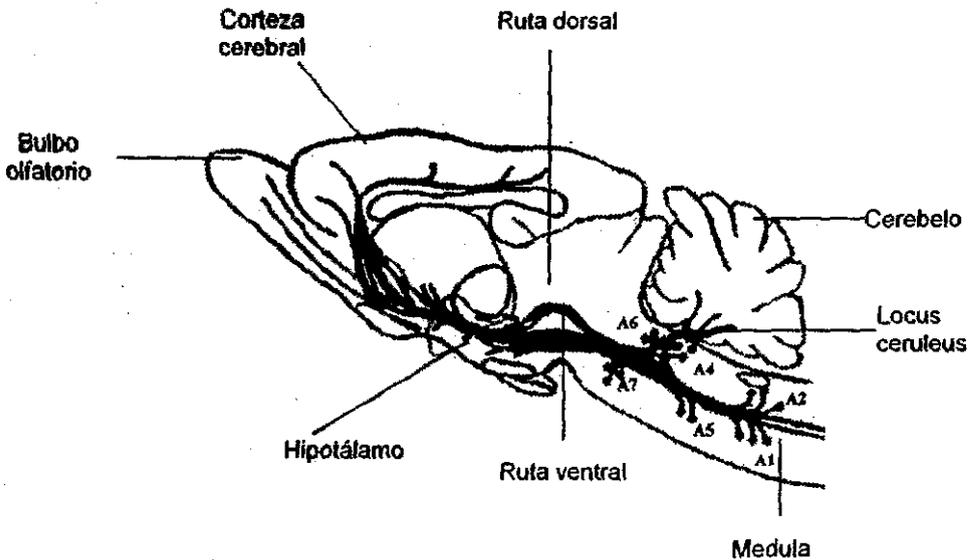


Figura 2. Esquema de un corte sagital del cerebro de la rata, en el que se muestra la localización de los paquetes celulares que sintetizan noradrenalina (A1-A7) y que inervan el locus ceruleus, el bulbo olfatorio, la corteza cerebral, núcleos hipotálamicos y la eminencia media (Tomado de Brown, 1994).

Los cuerpos celulares que contienen dopamina (DA) (que se identifican como A11, A12, A13 y A14) se localizan principalmente en el cerebro medio y se han descrito tres sistemas dopaminérgicos principales. El sistema nigro-estriado, donde los cuerpos celulares se localizan en la sustancia nigra y sus axones proyectan hacia el neostriado (núcleos caudado y putamen) y se considera parte del llamado sistema extrapiramidal. El sistema mesolímbico y mesocortical, que se originan en el área tegmental ventral del mesencéfalo, y envía sus axones hacia estructuras estriales, límbicas y corticales. El sistema tuberoinfundibular, con fibras relativamente cortas que nacen en el hipotálamo (núcleo arcuato y periventricular) y terminan en el sistema de vasos de la eminencia media y en el lóbulo intermedio de la hipófisis (Brown, 1994; Brailowsky, 1995) (Fig. 3).

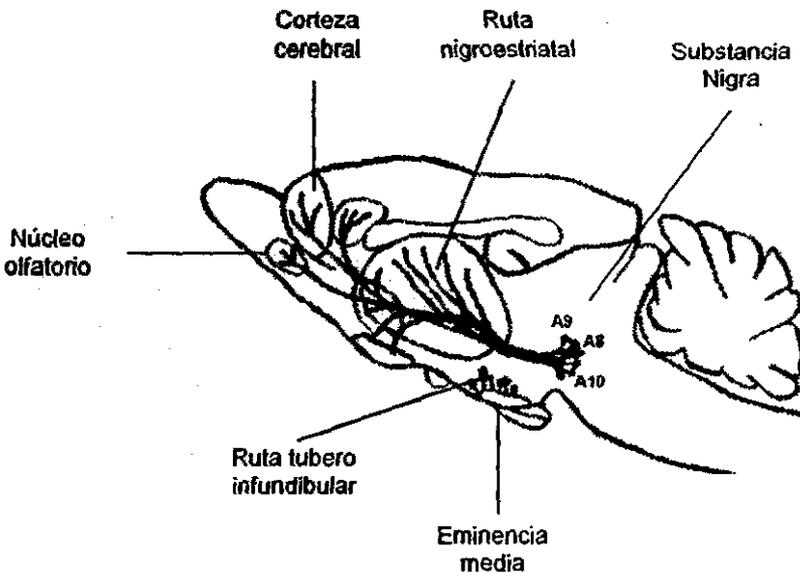


Figura 3. Esquema de un corte sagital del cerebro de la rata, en el que se muestra la localización de los paquetes celulares que sintetizan la dopamina (A8, A9 y A10) y la innervación que reciben las diferentes regiones del encéfalo como el cerebro medio, núcleo accumbens, lóbulo olfatorio, corteza cerebral y la eminencia media (Tomado de Brown, 1994).

En la eminencia media existe contacto axo-axonal entre las terminales dopaminérgicas y las terminales de las neurona GnRHérgicas (Jennes col., 1983). Estas evidencias anatómicas han permitido sugerir que la dopamina modula directamente la liberación de la GnRH (Fink 1986, 1988; Ojeda y Urbanski, 1994; Wray y Hoffman, 1986). También, en el área preóptica, las terminales nerviosas que contienen dopamina hacen sinápsis con el soma de la neurona productora de la GnRH (Fryer, 1980; Simerly y col., 1985; Nakai y col., 1986). El papel que se le ha atribuido a este neurotransmisor en la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas no ha sido establecido con exactitud, ya que algunos autores señalan que es estimulante (Meyerson y Sawyer, 1968), mientras que otros postulan que su función es inhibitoria (Advis col., 1978; Höhn y Wuttke, 1979; Fink, 1988).

Las células que contienen serotonina (5-HT) se localizan en el cerebro medio y están agrupadas en paquetés celulares que se denominan en conjunto núcleo del rafé y se identifican desde B1 hasta B9. Con base a la distribución de estos paquetés, este núcleo se divide en tres regiones, el núcleo dorsal, el núcleo medial y el núcleo del puente. Las fibras serotoninérgicas que se originan en estos núcleos inervan diferentes estructuras del sistema nervioso central, y ascienden de los núcleos dorsal y medial hasta el hipotálamo, la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, áreas rostrales del sistema límbico y la eminencia media. Los principales núcleos hipotalámicos que reciben inervación serotoninérgica son el supraquiasmático, arcuato y dorsomedial, el cuerpo mamilar y las áreas preóptica anterior y periventricular (Parent, 1979; Fryer, 1980; Frazer y Hensler, 1993) (Fig. 4).

Existe contacto axo-axonal entre las fibras que contienen serotonina y las que producen la GnRH en la eminencia media, y en el hipotálamo anterior (área preóptica y región septopreóptica) se identifican sinápsis axo-somática entre las fibras serotoninérgicas y el soma de la neurona productora de la GnRH (Jennes col., 1983; Kiss y Halász, 1985; Simerly y col., 1985). Estas evidencias anatómicas apoyan la idea de que la serotonina modula la secreción de la GnRH y por esta vía la de las gonadotropinas (Vitale y col., 1984; Kiss y Halasz, 1985; Brown, 1994). Sin embargo, la información de los efectos de la serotonina en la liberación de la GnRH y de las gonadotropinas hasta el momento es

contradictoria, debido a que algunos autores señalan que participa de manera estimulante en los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas (Vitale y col., 1984) mientras que otros señalan que su función es inhibitoria (Advis y col., 1978; Brown, 1994).

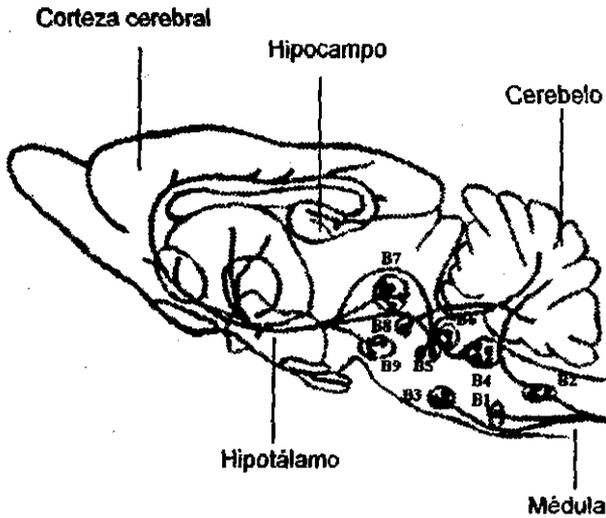


Figura 4. Esquema de un corte sagital del cerebro de la rata, en el que se muestra la localización de los paquetes celulares que producen la serotonina (B1-B9) y que inervan a la corteza cerebral, el núcleo caudado, el hipocampo, los núcleos hipotalámicos y la eminencia media (Tomado de Brown, 1994).

Estructura y funciones del ovario

El ovario es el órgano primario del aparato reproductor de la hembra debido a que por medio de sus secreciones regula el desarrollo y funcionamiento del mismo. Está conformado por una región central (médula) y una periférica (corteza), la central está constituida por tejido conectivo laxo, una masa de vasos sanguíneos y linfáticos y por nervios noradrenérgicos peptidérgicos que penetran por el hilo del ovario. La corteza rodea a la médula y contiene a los folículos ováricos en los diferentes estadios de desarrollo y el cuerpo lúteo (Ham, 1985; Lesson, 1985).

El folículo ovárico es la unidad anatómica y funcional del ovario, a partir del cual se generan los otros dos compartimientos del órgano: el luteal y el intersticial (células de la teca interna de folículos atrésicos) (Dominguez y col., 1991). El folículo está formado por el ovocito I (iniciada la meiosis). El ovocito es una célula cuyo tamaño varía entre 20 y 70 μm de diámetro. En esta célula, la primera fase de la meiosis finaliza un poco antes de que se lleve a cabo la ovulación y en ese momento el ovocito I se transforma en ovocito II, que es expulsado en el momento de la ovulación (Dominguez, 1991; Hirshfield, 1991; Ross y col., 1992).

Otro de los componentes del folículo es la membrana basal que aísla a las células de la granulosa de las células de la teca interna, rodeando a la teca interna se localiza un complejo de fibras de colágena, células de tejido conectivo, sustancia fundamental y fibras musculares lisas que en conjunto reciben el nombre de teca externa. Todos estos elementos forman una vaina fibrosa, la que al disgregarse en un punto cercano a la superficie del ovario, forman un orificio por el cual sale el ovocito. En función del grado de desarrollo del folículo se identifican tres tipos básicos de folículos: primordiales, en crecimiento (primarios y secundarios) y maduros o De Graaf (Dominguez y col., 1991 y Ross y col., 1992; Hiller, 1994) (Fig. 5).

Los folículos primordiales están constituidos por una capa de células foliculares aplanadas que rodean al ovocito. La secreción tónica de la FSH y la LH es necesaria para que los folículos inicien su desarrollo y entren al "pool" de folículos en crecimiento (Dominguez 1991; Hirshfield 1991; Ross y col., 1992; Hillier 1994).

Al folículo en crecimiento lo conforman el ovocito (que aumenta de tamaño) y las células foliculares que lo rodean, las cuales se encuentran en etapa de proliferación y adquieren un aspecto cúbico. En este estadio, el folículo recibe el nombre de primario, posteriormente se forman diversas capas de células de la granulosa. Cuando las capas de la granulosa alcanza un espesor de 6 a 12 hileras aparecen cavidades llenas de líquido llamado, líquido folicular, las cavidades tienden a unirse hasta formar una sola que se denominada antro, el folículo que presenta esta característica es llamado secundario o antral, (Ross y col., 1992). Conforme las células de la granulosa proliferan, las células que rodean al folículo también se diferencian y forman la teca folicular, inmediatamente por fuera de la membrana basal. En estos folículos se observa gran actividad mitótica de las células de la granulosa y de la teca, al mismo tiempo se incrementa el número de uniones entre las células de la granulosa, denominadas nexos, que sirven como vía de comunicación entre las células foliculares (Hirshfield 1991; Greenwald y Roy 1994; Ross y col., 1992).

La primera evidencia de que se inicia el crecimiento del folículo es el aumento del tamaño del ovocito, seguido del desarrollo, la proliferación y diferenciación de las células de la granulosa. Todos los eventos que conducen al crecimiento del folículo son estimulados por la FSH, la LH y los estrógenos, estos últimos actúan de forma sinérgica con las gonadotropinas y estimulan la aparición de los receptores a las mismas en las células foliculares (Dominguez y col., 1991; Ross y col., 1992).

Además del aumento del tamaño del folículo, durante el desarrollo de esta estructura se inicia un proceso de diferenciación de las células de la granulosa, lo que permite que se organicen en regiones definidas morfológicamente y que cumplen funciones específicas. Las células de la granulosa que se encuentran junto al ovocito tienen la función de proporcionarle

nutrientes al folículo en crecimiento, mientras que las células del cumulus le proporcionan el soporte físico al ovocito y posiblemente también contribuyen a nutrirlo, las células de la granulosa que se encuentran adyacentes a la membrana basal son las primeras en las que se expresan los receptores a la LH y por tanto son capaces de sintetizar andrógenos en respuesta a esta hormona (Amsterdam y col., 1975; Midgley 1972 citados en Gore-Langton y Armstrong, 1994).

En los folículos secundario los receptores a la FSH están limitados a la células de la granulosa y los receptores a la LH a las células de la teca, conforme el folículo se desarrolla las células de la granulosa poseen los receptores para ambas hormonas (Hirshfield 1991; Greenwald y Roy, 1994).

En los folículos secundarios se empieza a acumular líquido en el antro, el que aumenta de tamaño conforme se desarrollan los folículos. En este líquido se encuentran la FSH, LH, PRL, el factor inhibidor de la maduración del ovocito (IMO), un polipéptido con características semejantes a la GnRH, inhibina, diferentes neurotransmisores que son producidos por las células de la granulosa, andrógenos, progesterona y estrógenos (Dominguez y col., 1991; Ross y col., 1992).

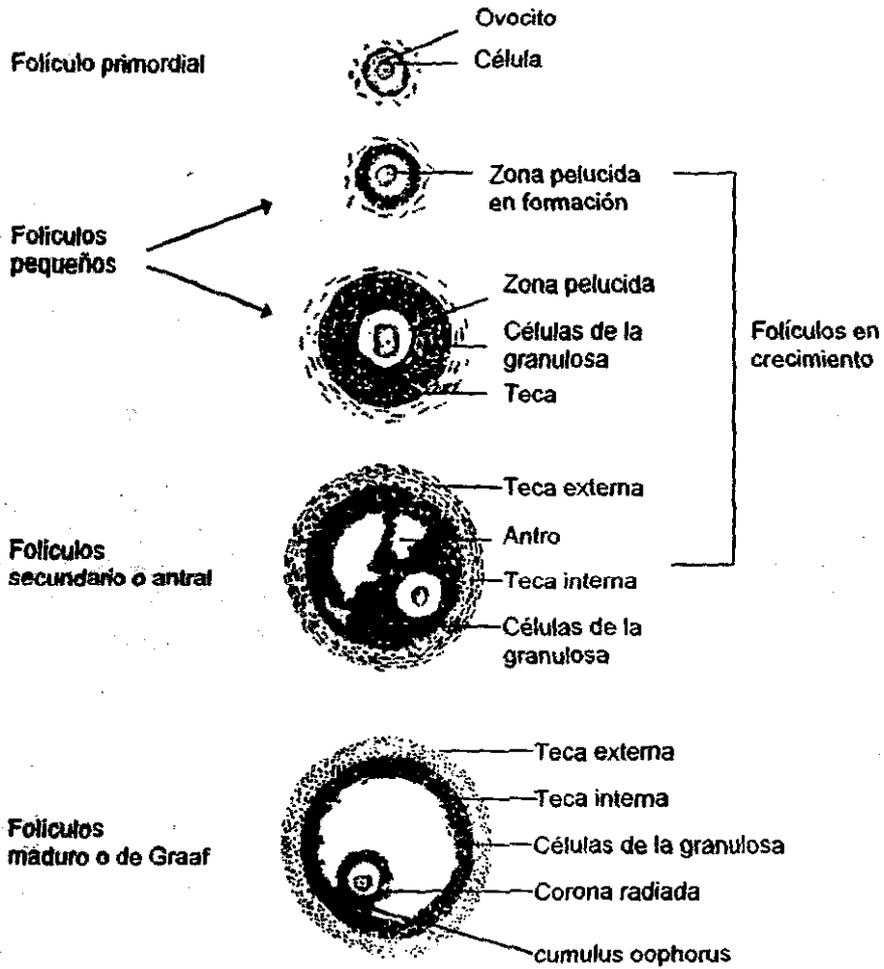


Figura 5. Esquema donde se muestran folículos en diferentes estadios de desarrollo: primordiales, en crecimiento y preovulatorios, así como sus diferentes componentes (Tomado de Ross y col., 1992).

El folículo maduro o de Graaf es capaz de liberar al ovocito (ovulación) (Feder 1981; Ross y col., 1992). En este estadio la FSH estimula directamente la proliferación de las células de la granulosa y la secreción de las hormonas esteroideas por estas células. Sin embargo, la secreción de los esteroideos sexuales por el folículo preovulatorio depende principalmente de la acción de la LH (Hillier, 1994). Cuando el folículo alcanza su tamaño máximo, disminuye la actividad mitótica de las células de la granulosa, mientras que el antro continúa creciendo, las células del cumulus que están en contacto directo con el ovocito, constituyen la corona radiada (Hirshfield, 1991; Ross y col., 1992). Los folículos preovulatorios se diferencian porque las células de la granulosa poseen receptores a la FSH y la LH y las células de la teca únicamente a la LH (Feder, 1981; Domínguez y col., 1991; Ross y col., 1992; Greenwald y Roy, 1994).

Además de la acción de la FSH y LH en la transformación del folículo primordial a la etapa de preovulatorio, otras hormonas hipofisarias también regulan este proceso como son la PRL y la hormona del crecimiento (GH), que al actuar en el ovario estimulan el desarrollo del folículo y la formación de los receptores a la LH en las células de la granulosa y aumenta la producción de las hormonas esteroideas (Ojeda y Urbanski, 1994).

Del conjunto de folículos que inician su desarrollo no todos alcanzan a completar su ciclo de crecimiento y ovular, debido a que experimentan un proceso de degeneración y transformación que recibe el nombre de atresia folicular. Este proceso puede iniciarse en cualquier etapa del desarrollo de esta estructura (Domínguez y col., 1991; Greenwald y Roy 1994; Hsueh y col., 1994).

La atresia folicular

La atresia folicular esta caracterizada por alteraciones bioquímicas e histológicas que se presentan en los diferentes componentes del folículo. Los cambios bioquímicos incluyen reducción en la síntesis de DNA en las células de la granulosa, disminución de la expresión de los receptores a la FSH y LH, disminución en la síntesis de estrógenos y aumento en la

producción de progesterona y andrógenos, ausencia de las proteínas que permiten las conexiones entre las células de la granulosa (desmosomas y nexos) (Ryan, 1981; Hsueh y col., 1994; Greenwald y Roy, 1994). Las alteraciones histológicas que caracterizan la atresia incluyen disminución de la multiplicación celular (mitosis), presencia de células con núcleo picnótico, hipertrofia de las células de la teca (engrosamiento de la teca), disminución del riego sanguíneo e inicios de luteinización, separación de las células de la granulosa y presencia en el antro (descamación de las células), fragmentación del ovocito o cambios de forma del mismo (alteración del ovocito) (Ryan, 1981; Hsueh y col., 1994; Greenwald y Roy, 1994).

La atresia folicular es un proceso que se presenta en el ovario de los vertebrados mamíferos y no mamíferos (Saidapur 1978 citado Greenwald y Shyamal, 1994). Al inicio de la pubertad en el ovario de la mujer están presentes aproximadamente 400,000 ovocitos y durante la vida fértil maduran únicamente 400, mientras que la mayoría de ellos se pierden en forma gradual por el proceso de atresia (Ross y col., 1992; Hsueh y col., 1994). Se estima que en los ovarios de la mujer alrededor del 99% de los folículos presentes entran al proceso de atresia, en el ratón alrededor del 70% (Byskov, 1978 citado en Greenwald y Roy, 1994) y en la rata alrededor del 92% (Ryan, 1981).

La atresia en los folículos pequeños sin antro (preantrales) es un evento poco conocido, en cambio se ha observado que en el ovario de la rata el 70% de los folículos atrésicos poseen antro (antrales) (Zuckerman, 1977 citado en Greenwald y Roy, 1994). En los folículos secundarios o antrales, la presencia o no de atresia es regulada por diversos factores hormonales tales como las gonadotropinas, los esteroides sexuales y otras secreciones del propio ovario que ejercen su acción a nivel local (Greenwald y Roy 1994; Hsueh y col., 1994).

Hasta el momento no se sabe cuando se inicia la atresia folicular. Algunos autores sugieren que un folículo se puede considerar atrésico cuando en un corte de ovario se observa que una o dos células de la granulosa del folículo presentan picnosis, mientras que otros

consideran que esta alteración debe estar presente en el 5% de las células de la granulosa (Greenwald y Roy, 1994).

Byskov (Byskov 1974 citado en Greenwald y Roy, 1994; Hsueh, y col., 1994) plantea que en el ovario del ratón, la atresia folicular se presenta de forma gradual y se identifican tres etapas. La primera etapa se caracteriza por la presencia de picnosis en el 20% de las células de la granulosa, principalmente en las que se localizan alrededor de la cavidad antral, disminuye la incorporación de [³H] timidina en estas células y en algunas se observan figuras de mitosis, mientras que la membrana basal permanece intacta. En la segunda etapa además de las características antes mencionadas algunas de las células de la granulosa invaden el antro, los leucocitos empiezan a invadir las células de la granulosa, la membrana basal se fragmenta y se presenta la hipertrofia e hiperplasia de las células de la teca y los folículos atresícos son invadidos de linfocitos T citotóxicos, esta última característica ha permitido sugerir que el sistema inmune participa en la degeneración de los folículos. La tercera etapa se caracteriza porque únicamente el 5% de las células de la granulosa presentan picnosis, posiblemente debido a que los macrófagos u otros grupos celulares del sistema inmune las eliminaron, no se observa multiplicación celular, lo que se refleja en un menor número de células de la granulosa y también se presenta la regresión de la teca.

Los cambios histológicos específicos en las células de la granulosa en etapas adelantadas de atresia incluyen: fragmentación de la membrana basal, presencia de núcleo picnotico, reducción en el número de células de la granulosa y ruptura de la vesícula germinal (Hsueh y col., 1994).

Biosíntesis de los esteroides ováricos

Durante el proceso de crecimiento y diferenciación del folículo este adquiere la capacidad de sintetizar los esteroides sexuales. La secreción de estas hormonas es regulada por la FSH, LH, PRL, los neurotransmisores y por algunos factores de crecimiento como el

factor de crecimiento epidermal (EGF), factores de crecimiento transformante (TGF_{α} y TGF_{β}), factor de crecimiento insulina-like (IGF), factor de crecimiento neural (NGF), factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF), la prostaglandina PGE_2 y los propios andrógenos y estrógenos cuya acción esta asociada a la función de la FSH y la LH (Hillier, 1994; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Las células de la teca obtienen de la sangre el colesterol, molécula precursora para la síntesis de las hormonas esteroides. El primer paso en la biosíntesis de las hormonas esteroides es la formación de pregnenolona, esto se logra por la unión de la LH a su receptor de membrana en las células de la teca, así se activa a la enzima adenilato ciclasa que induce la formación de AMPcíclico y estimula la síntesis y la actividad de la enzima citocromo P_{450} que cataliza la formación de pregnenolona a partir de colesterol. La pregnenolona puede entrar a dos rutas estereoidogénicas, la ruta Δ^5 o la Δ^4 . En la ruta Δ^5 , la pregnenolona (P_3) se convierte a 17α -hidroxipregnenolona y posteriormente a dehidroepiandrosterona por acción del complejo enzimático 17α -hidroxilasa y C_{17-20} liasa (citocromo P_{450}). Mientras que, en la ruta Δ^4 la pregnenolona se transforma a progesterona (P_4) y esta se convierte a 17α -hidroxiprogesteroa por acción de la enzima 17α -hidroxilasa. Esta última hormona por acción de la C_{17-20} liasa se biotransforma a androstenediona que se convierte a testosterona. La testosterona y la androstenediona (andrógenos) atraviesan la membrana basal y pasan a las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos por acción de la enzima aromatasa, que se activa por la unión de la FSH a su receptor de membrana (Ross y col., 1992; Hillier, 1994 y Gore-Langton y Armstrong, 1994) (Fig. 6).

La secreción de las hormonas esteroides por el ovario dependen de la etapa de crecimiento y diferenciación del folículo y es un proceso regulado por señales endocrinas que involucran a las gonadotropinas y también depende de mecanismos de regulación paracrina y autocrina (Greenwald y Roy, 1994; Hillier, 1994).

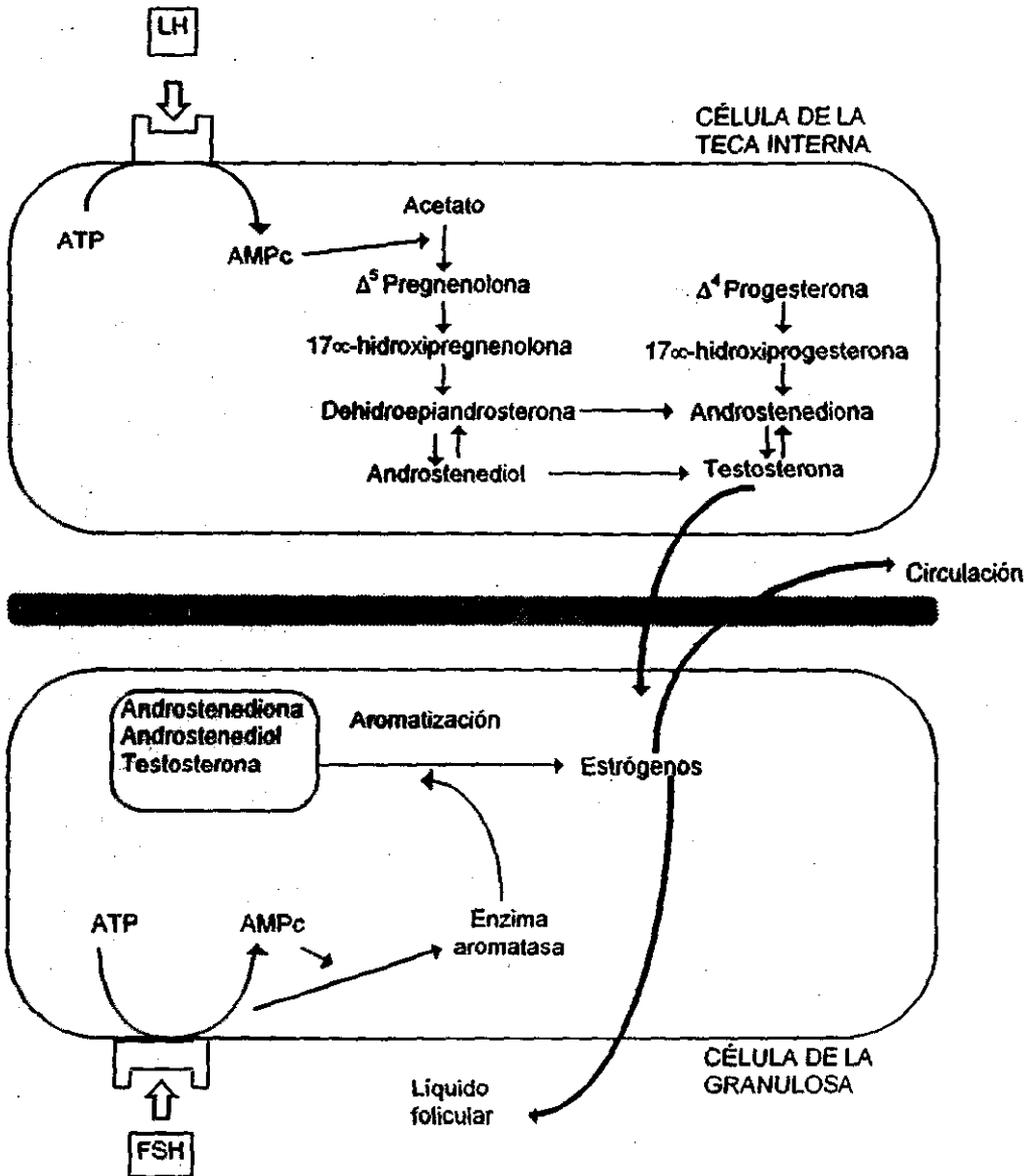


Figura 6. "Teoría de la "doble célula" que explica la síntesis de los andrógenos y estrógenos. Los andrógenos se secretan en respuesta a la unión de la LH en las células de la teca interna. En las células de la granulosa los andrógenos son aromatizados a estrógenos, los cuales son secretados a la circulación o al líquido folicular (Modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).

La FSH también regula de manera indirecta la producción de hormonas ováricas, debido a que induce la diferenciación de las células de la granulosa y la síntesis de factores hormonales no esteroideos, como la activina, inhibina, el IGF, y los TGF α y TGF β (Jones y col., 1982; Knecht y Catt, 1983; Franchimont y col., 1986; Steinkampf y col., 1988 citados en Hillier, 1994). El TGF β que se produce en las células de la teca y de la granulosa inhibe la síntesis de andrógenos y estimula la acumulación de progesterona, además *in vitro* promueve la proliferación de las células de la granulosa (Dorrington y col., 1988 y Magoffin y col., 1989 citados en Hillier 1994). Mientras que, el IGF actúa de manera sinérgica con la FSH, en la inducción del crecimiento y diferenciación de las células de la granulosa, además incrementa la síntesis de los andrógenos por las células de la teca (Adashi y col., 1991; Barbieri y col., 1993 citados en Hillier, 1994).

La activina es producida en grandes cantidades por los folículos pequeños, medianos y en menor cantidad por los preovulatorios (Hillier y Miro, 1993 citado en Hillier, 1994) y cumple diversas funciones que incluyen proliferación de las células de la granulosa (González-Macho y Vale, 1989 citado en Hillier, 1994), inhibe la síntesis de andrógenos inducida por la administración de LH/IGF, aumenta la actividad de la aromatasa debido a que sensibiliza a las células de la granulosa a la FSH en los folículos pequeños y medianos (Hutchinson y col., 1987; Miro y col., 1991 citado en Hillier, 1994). Otra función de la activina es estimular la producción de la progesterona en las células de la granulosa de los folículos inmaduros, sin embargo en los folículos maduros esta misma gónadocrinina inhibe la síntesis de progesterona (Miro y col., 1991, citado en Hillier, 1994). Esta última evidencia permite pensar que la participación de esta hormona en la estereidogénesis depende de la etapa del desarrollo del folículo.

Por otra parte se ha observado que pequeñas cantidades de inhibina aumentan la producción de andrógenos inducida por la LH y el IGF (Hillier y col., 1991 citado en Hillier, 1994). Los folículos preovulatorios sintetizan gran cantidad de inhibina la cual estimula la síntesis de los andrógenos por las células de la teca, lo que se traduce en un aumento en la

producción de estrógenos en respuesta a la LH (Hillier, 1991; Hillier y Miro, 1993 citados en Hillier, 1994).

Control hormonal de la atresia folicular

Las principales causas que inducen la atresia folicular, aún no se han identificado. Hsueh y col., (1994) sugieren que son tres los factores que determinan la atresia en los folículos. En primer lugar, señalan que este evento puede estar vinculado a deficiencias inherentes al ovocito o a las células de la granulosa; en segundo lugar proponen que los folículos entran al proceso de atresia cuando son expuestos a factores inductores de atresia (atretogénicos), entre los que se encuentran los andrógenos, GnRH-like, interleucina-6 (IL-6) y la activina. Por último, sugieren que únicamente los folículos que se encuentran en ciertas etapas de desarrollo y en un medio hormonal determinado, alcanzan el estadio de folículo preovulatorio y llegan a ovular (Hsueh y col., 1994). Algunas de las señales hormonales que rescatan a los folículos de la atresia incluyen a las gonadotropinas, los estrógenos, el EGF, el NGF, el IGF-I y el FGF (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994).

Las gonadotropinas son consideradas como un factor de supervivencia folicular (Hsueh y col., 1994, Hillier, 1994, Greenwald y Roy, 1994). Cuando los folículos son expuestos a la FSH tanto *in vivo* como *in vitro* disminuye el proceso de atresia y continúan su desarrollo hasta alcanzar la etapa de folículo preovulatorio (Braw y Tsafirri 1980; Hsueh y col., 1994; Greenwald y Roy, 1994). En la rata, al bloquear la secreción preovulatoria de las gonadotropinas en la tarde del proestro, se incrementa la incidencia de atresia folicular. Mientras que, en la rata prepúber hipofisectomizada y sometida al estímulo hormonal con FSH, disminuye este proceso (Hsueh y col., 1994).

Durante el ciclo estral de la rata se presentan ondas de desarrollo folicular. Se describe que el reclutamiento de los folículos que inician su desarrollo, esta correlacionado con el segundo pico de secreción de la FSH, es decir el aumento en la secreción de esta hormona precede a las ondas de desarrollo folicular, por otra parte las alteraciones en la secreción de la

FSH induce cambios en el número de folículos reclutados para iniciar su desarrollo (Fortune, 1994).

Se sugiere que los esteroides sexuales juegan un papel importante en la regulación de la atresia folicular, debido a que el tratamiento con estrógenos incrementa el crecimiento folicular y el índice mitótico de las células de la granulosa. En cambio, los andrógenos disminuyen el peso del ovario e incrementan la atresia folicular en ratas hipofisectomizadas tratadas con estrógenos (Hsueh y col., 1994).

La inhibina y la activina también participan en la regulación de la atresia. La administración de inhibina en los ovarios de ratas inmaduras induce incremento en el número de folículos antrales medianos, mientras que la inyección de activina provoca atresia folicular (Woodruff y col., 1990 citado en Hsueh y col., 1994). Además, el tratamiento con activina inhibe la acción estimuladora de la gonadotropina de suero de yegua preñada (PMSG) en el desarrollo folicular.

La estructura y funcionamiento del eje hipotálamo-hipófisis-ovario característico del animal adulto y que se traduce en la regulación de la reproducción de las diferentes especies y la perpetuación de las mismas, es el resultado del establecimiento de un conjunto de mecanismos neuroendócrinos que se producen a diferentes tiempos de la vida del animal dependiendo de la especie en estudio, para el caso de la rata la maduración de este eje se desarrolla en un lapso de tiempo que comprende desde el nacimiento hasta el inicio de la pubertad.

Pubertad

En los mamíferos el inicio de la etapa reproductora está marcada por la pubertad, que es la fase biológica de un individuo entre la inmadurez y la madurez sexual, en la que se producen una serie de cambios neuroendócrinos y fenotípicos. En la hembra de los roedores la pubertad se define como el día en que se canaliza la vagina (que normalmente permanece

no perforada en las ratas inmaduras) y se presenta la primera ovulación. Este evento ocurre entre los 35 y 45 días de edad y en el ratón entre los 30 y 35 días de vida (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

En la rata, el desarrollo de los mecanismos involucrados con el inicio de la pubertad se producen en un lapso de tiempo muy corto de cinco semanas, durante el cual se suceden una serie de cambios morfológicos y fisiológicos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Con base a estos cambios, Ojeda y Urbanski, (1994) han propuesto una clasificación del desarrollo prepuberal de la rata en cuatro fases: neonatal, infantil, juvenil y peripuberal.

A. Fase neonatal

Esta etapa se inicia desde el nacimiento y culmina el día siete de vida. En los primeros cuatro días de vida de la rata, el ovario es relativamente insensible a la FSH y la LH, es decir que el crecimiento folicular se inicia en forma independiente de dichas hormonas, debido a que en el ovario aun no se han expresado los receptores a las mismas. El control del desarrollo folicular por las gonadotropinas se inicia al día cuatro de vida, debido a que a partir de este momento las células de la granulosa del folículo ovárico ya presentan receptores a la FSH, y ésta estimula la conversión de la testosterona a estrógenos. Sin embargo, el mecanismo de retroalimentación negativo que ejercen estas hormonas ováricas sobre el eje hipotálamo-hipófisis-gonada no es funcional. Al parecer este evento no se debe a la ausencia de los receptores a estrógenos en el hipotálamo e hipófisis, sino a la presencia de altas concentraciones plasmáticas de α -fetoproteína, la cual se une fuertemente a los estrógenos tornándolos biológicamente inactivos (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Domínguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994).

Al final de esta etapa el contenido de la GnRH en el hipotálamo y la concentración de la FSH en suero comienzan a aumentar, mientras que la LH se mantiene baja (Domínguez

y col., 1991; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994), y en el ovario se incrementa significativamente la concentración de el TGF α (Ojeda y Urbanski, 1994).

B. Fase infantil

Transcurre del día ocho al veintiuno de edad. Esta etapa se caracteriza por el aumento en la concentración de la FSH en el plasma, alcanzando su valor más alto alrededor del día doce a quince y después disminuye. La secreción de la LH se presenta en forma de picos esporádicos, que mantiene la concentración moderadamente alta de dicha hormona, tal patrón de secreción parece ser menos evidente conforme avanza el desarrollo del animal y desaparece al inicio de la etapa juvenil. Al parecer la alta concentración de la FSH es necesaria para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a ovular en la pubertad (Domínguez y col., 1991; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994). Además, al final de esta fase se observa que en el ovario de la rata predominan los folículos preantrales (Dhanasekaran 1986 citado en Greenwald y Roy, 1994).

En el área preóptica hipotalámica anterior y en el hipotálamo medio basal se inicia la maduración morfológica (desarrollo del árbol dendrítico) de las neuronas GnRHérgicas (Ojeda y Urbanski, 1994). Así mismo, el sistema neuronal productor de la GnRH, tiene la capacidad de generar pulsos de secreción de la hormona, estos pulsos se incrementan conforme avanza la edad del animal y es posible que esto determine el patrón de secreción de la FSH en esta fase. Además, la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH es mayor en animales infantiles que en los juveniles, lo cual puede ser consecuencia de un mayor número de receptores presentes en la hipófisis durante esta fase (Ojeda y Urbanski, 1994).

En esta etapa la concentración de la GnRH en el hipotálamo aumenta hasta los 21 días de edad y posteriormente se mantiene constante (Araki y col., 1975). A partir del día quince de vida la concentración de la FSH disminuye y desaparecen los picos de secreción de

la LH. Aunado a los eventos antes mencionados, la concentración plasmática de la α -fetoproteína disminuye y una mayor cantidad de estrógenos quedan libres, lo que provoca que el mecanismo de retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas se manifieste.

Durante esta fase se incrementa la producción de estrógenos a partir de los andrógenos y la FSH es capaz de inducir la actividad de la enzima aromatasas, por tanto el ovario es capaz de sintetizar mayores cantidades de estrógenos que son responsables del incremento en la secreción de las gonadotropinas (Dominguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994). Los estrógenos producidos por los folículos en desarrollo estimulan la proliferación de las células de la granulosa y modifican la respuesta de estas a la FSH (Dominguez y col., 1991; Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994). Todos estos cambios propician que aumente la sensibilidad del ovario a las gonadotropinas, así como el crecimiento de los folículos. Además, durante esta fase aparecen los receptores a la GnRH en el ovario (Ojeda y Urbanski, 1994).

C. Fase juvenil

Se inicia en el día 23 y termina alrededor del día 30-32. En esta fase, la concentración de la FSH y la LH en el plasma es baja y al final se establece un patrón de secreción pulsátil de la hormona luteinizante. Así mismo, se incrementa la secreción de la LH en respuesta a los estrógenos, ya que en esta etapa la secreción tónica de las gonadotropinas es regulada por el mecanismo de retroalimentación negativa de los estrógenos, los cuales reemplazan a los andrógenos aromatizables que juegan un papel predominante durante el desarrollo infantil (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Durante esta fase la neurona GnRHérgica se ha diferenciado completamente y posee una superficie irregular que posiblemente le permita establecer un mayor número de sinapsis

con los sistemas que regulan su funcionamiento y que se refleja en el aumento en la actividad de dicha neurona (Ojeda y Urbanski, 1994). Sin embargo, Araki y col. (1975) señalan que la concentración de la GnRH en el hipotálamo permanece constante de los 21 a los 28 días de edad.

En el ovario se presentan oleadas de desarrollo y atresia folicular, al igual que las gonadotropinas la PRL estimula el desarrollo de los folículos y la formación de los receptores a la LH en las células de la granulosa, lo cual se refleja en un aumento en la secreción de los estrógenos, por lo que se sugiere que dicha hormona sensibiliza al ovario a los efectos estimulatorios de la LH y la FSH (Dominguez y col., 1991; Hsueh y col., 1994; Ojeda y Urbanski, 1994). Por otra parte, al final de esta etapa el número de receptores a la GnRH en el ovario es máximo (Ojeda y Urbanski, 1994).

D. Fase peripuberal

Su duración es variable y se asocia con la primera ovulación. Se establece el patrón circadiano de secreción de la LH. El aumento en los pulsos de secreción de la LH estimulan al ovario para una mayor producción de estrógenos. En el ovario el número de receptores a la FSH y LH es máximo, lo que se traduce en una mayor respuesta esteroideogénica de este, por ello la concentración de estrógenos, progesterona y testosterona se incrementan significativamente en relación a la etapa juvenil (Dominguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994). Estos eventos se reflejan en un mayor desarrollo de los folículos que están destinados a ovular el día del primer estro. Así mismo, en el día en que se presenta el primer pico de secreción preovulatorio de la gonadotropinas, disminuye el número de receptores a la GnRH en el ovario (Ojeda y Urbanski, 1994).

Además, se manifiesta el mecanismo de retroalimentación positivo que ejercen los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas. Al parecer en esta fase los estrógenos

son capaces de modular el sistema productor de la GnRH, cuya secreción se incrementa en los días previos a la pubertad y culmina con el pico de secreción preovulatorio de la FSH y la LH (Araki y col., 1975). Ambas hormonas al actuar sobre el ovario estimulan el crecimiento y la maduración del folículo preovulatorio y como consecuencia la primera ovulación (Domínguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994).

Los eventos que conducen a la primera ovulación y al inicio de la pubertad, posiblemente están vinculados a un mecanismo neural central que modula la secreción de la GnRH por el hipotálamo. Este mecanismo involucra la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión, los cuales participan en la regulación del sistema secretor de la GnRH durante el desarrollo prepuberal y generan la señal que se traduce en la secreción preovulatoria de las gonadotropinas y la primera ovulación.

En la rata adulta y durante el desarrollo prepuberal de la misma, se presentan cambios en el patrón de secreción de las gonadotropinas (Fink, 1986; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994). Es posible que estos cambios estén vinculados a modificaciones en la concentración y en la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión en el hipotálamo y en otras estructuras del sistema nervioso central.

Sistemas de neurotransmisión y regulación de la secreción de las gonadotropinas

Con el empleo de diversos modelos experimentales, se ha mostrado que en la rata adulta y prepúber el sistema catecolaminérgico y serotoninérgico entre otros, participan en la regulación de la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y la ovulación (Fink, 1986, 1988; Ojeda y Urbanski, 1994).

Los primeros estudios que se realizaron para analizar los cambios en la concentración de estos sistemas de neurotransmisión en las diferentes regiones del cerebro de la rata durante el desarrollo prepuberal y en la etapa adulta, incluyen los de Santiago y col. (1988),

quienes mostraron que la concentración de la dopamina, noradrenalina y serotonina, así como la de sus principales metabolitos en el hipocampo de la rata se incrementan desde el día del nacimiento hasta los 90 días de edad. Estos resultados los llevaron a pensar que los cambios en estos sistemas de neurotransmisión, están vinculados al desarrollo de algunas actividades motoras, de aprendizaje o memoria en la rata, que se manifiestan con la edad del animal.

En la rata adulta cíclica la administración de reserpina (fármaco que disminuye la actividad del sistema catecolaminérgico) en el proestro, disminuye la concentración de serotonina, dopamina y noradrenalina en el hipotálamo y bloquea la ovulación en el estro. Sin embargo, si previo al tratamiento con reserpina a los animales se les administra pargilina y nialamida, inhibidores de la monoamino oxidasa (enzima que degrada las catecolaminas), no se modifica la ovulación ni la concentración de estos neurotransmisores en el hipotálamo. Estos resultados llevaron a sugerir a los autores que las catecolaminas regulan de manera estimulante la secreción de las gonadotropinas y la ovulación (Meyerson y Sawyer, 1968).

Kerdelhué y col. (1989) mostraron que en la rata hembra adulta cíclica la concentración de la dopamina en la eminencia media permanece constante en las diferentes fases del ciclo estral, excepto en la tarde del diestro, donde se observa la disminución significativa, mientras que la concentración de 5-HT y la actividad de la neurona serotoninérgica es mayor en la mañana del proestro, y la actividad de la neurona dopaminérgica disminuye en este día. Estos datos permitieron sugerir que la dopamina y la serotonina están involucrados en los eventos asociados con la liberación preovulatoria de la LH.

Carr y Voogt (1980) observaron que en la rata hembra adulta la actividad de la tirosina hidroxilasa (enzima que transforma el aminoácido tirosina a L-DOPA) en el hipotálamo medio basal es baja a la 12 horas del proestro, mientras que la actividad de dopamina- β -hidroxilasa (enzima limitante en la síntesis de NA) se incrementa. Estos resultados les permitieron sugerir que el incremento en la actividad de la neurona noradrenérgica y la disminución en la actividad de la neurona dopaminérgica en el hipotálamo

medio basal, son eventos necesario para que se lleve acabo la liberación preovulatoria de la LH.

Así mismo, también se ha mostrado que en el hipotálamo de la rata prepúber la concentración de la noradrenalina, la dopamina, la serotonina y sus metabolitos el ácido homovanílico, el ácido 3,4-dihidroxifenil acético y el ácido 5-hidroxiindolacético respectivamente, se incrementa a lo largo del desarrollo posnatal de la rata y los valores más altos se detectan entre los 15 y 22 días de edad (Rivera y col., 1991). Sin embargo, Macho y col. (1986) señalan que la concentración de la noradrenalina y la adrenalina en esta estructura aumenta a lo largo del desarrollo de la rata, mientras que la dopamina y serotonina son altas a partir del día 12 de vida, pero en las siguientes edades disminuye.

En el área preóptica hipotalámica anterior la concentración de serotonina y su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético es similar entre la hembra y el macho durante la etapa prepuberal o en la fase adulta. En ambos grupos, la concentración de este neurotransmisor se incrementa en el día 20 y posteriormente disminuye. Además, la mayor actividad del sistema serotoninérgico se presenta en los primeros cuatro días de vida del animal y disminuye conforme avanza el desarrollo, este comportamiento es similar entre la hembra y el macho. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que no existe relación entre la actividad del sistema serotoninérgico del área preóptica hipotalámica anterior y la acción de las hormonas esteroideas involucradas en la diferenciación sexual de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas (Wats y Stanley, 1984).

En conjunto estos estudios muestran que existen cambios en la concentración de monoaminas en el hipotálamo y estructuras extrahipotalámicas, sin embargo existen pocos estudios que muestren su vinculación con las modificaciones en la concentración de gonadotropinas durante el desarrollo prepuberal de la rata.

Se sugiere que la dopamina, noradrenalina y serotonina participan en el inicio de la pubertad en la rata hembra. Durante el desarrollo prepuberal de la rata se ha observado que el

pico de secreción de la FSH que se presenta a los 15 días de edad se acompaña de la disminución en la recaptura de noradrenalina y dopamina en el área preóptica medial y en el hipotálamo medio basal. Mientras que, del día 20 a los días previos a la pubertad la concentración de esta hormona es baja y la recaptura de ambos neurotransmisores se incrementa (Höhn y Wuttke, 1979). Así mismo, se señala que previo al primer pico preovulatorio de la LH se incrementa la concentración de la noradrenalina y disminuye la recaptura de la dopamina y la serotonina (Advis y col., 1978). En conjunto estos resultados permiten a los autores concluir que la noradrenalina y la dopamina inhiben la secreción de la FSH durante el desarrollo prepuberal de la rata, sin embargo en la secreción preovulatoria de la LH la noradrenalina participa de manera estimulante, mientras que la dopamina y la serotonina ejercen un efecto inhibitorio.

Durante el desarrollo prepuberal de la rata, Krieger y Wuttke (1980) miden la actividad de la tirosina hidroxilasa y la dopamina - β - hidroxilasa en el área preóptica medial (POM) y el hipotálamo medio basal anterior y posterior (HMBA y HMBP) y lo relacionan con los cambios en la secreción de la FSH, la LH y la PRL, y observan que la actividad de la tirosina hidroxilasa es baja en POM y HMBA a lo largo del desarrollo posnatal, mientras que en HMBP la actividad de esta enzima aumenta a partir de los 25 días de edad. En cambio, la actividad de la dopamina - β - hidroxilasa en POM y HMBA es alta a los 15 días y disminuye gradualmente hasta los 35 días de edad. Mientras que, en HMBP la actividad de esta enzima aumenta conforme el animal se desarrolla. Los autores concluyen que la actividad de estas enzimas no se relaciona con los cambios en la secreción de las gonadotropinas y la PRL.

Otro estudio que sugiere la participación de las catecolaminas en la regulación de la secreción de las gonadotropinas es el realizado por Moguilevsky y col. (1990) quienes muestran que la administración de la α -metil tirosina (inhibidor de la tirosina hidroxilasa), a ratas de 14 y 16 días de edad incrementa la concentración de la FSH y la LH sérica, en cambio cuando este mismo tratamiento se realiza en animales de 30 días de edad o adultos disminuye la secreción de la LH y la FSH no se modifica. Estos resultados los llevaron a

sugerir que entre los 14 y 16 días de edad las catecolaminas ejercen un efecto inhibitorio en la secreción de las gonadotropinas y a los 30 días de edad y en la etapa adulta su efecto es estimulante.

Planteamiento del problema

Con base en los antecedentes mencionados se señala que la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas es modulada por el sistema noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico, los cuales actúan en el hipotálamo anterior y medio (centros de regulación de la secreción cíclica y tónica de la FSH y la LH). Así mismo, se sabe que las gonadotropinas regulan el crecimiento y maduración del folículo ovárico y la secreción de las hormonas esteroides por este órgano, eventos que se inician durante los primeros días de vida de la rata. Sin embargo, hasta el momento no existe información sobre las modificaciones en la concentración de estos sistemas de neurotransmisión en el hipotálamo anterior, medio y posterior y la concentración sérica de la LH, 17β -estradiol y progesterona, así como la vinculación de estos eventos con los cambios en el crecimiento y maduración del folículo ovárico durante el desarrollo prepuberal de la rata y en los días previos a la pubertad. Por ello, en el presente trabajo se decidió analizar los eventos antes mencionados durante el desarrollo posnatal de la rata hembra. Los resultados obtenidos en este trabajo, permitirán comprender algunos de los mecanismos neuroendócrinos que se establecen en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante el desarrollo de la rata hembra y que culminan con el inicio de la actividad reproductiva.

Hipótesis

Los sistemas de neurotransmisión regulan la secreción de las gonadotropinas y estas a su vez estimulan el crecimiento y maduración del folículo ovárico y la secreción de las hormonas esteroideas. Por lo que, los cambios en estos dos últimos procesos durante el desarrollo prepuberal de la rata, están relacionados con el patrón de secreción de la LH.

Objetivos

- Analizar los cambios en el crecimiento y maduración del folículo ovárico durante el desarrollo prepuberal de la rata.
- Evaluar los cambios en la concentración de la LH, 17β -estradiol y progesterona en suero a lo largo del desarrollo prepuberal de la rata.
- Analizar los cambios en la concentración de la noradrenalina, dopamina, serotonina y sus principales metabolitos en el hipotálamo anterior, medio y posterior durante el desarrollo prepuberal de la rata.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras de 10, 12, 14, 16, 18, 21, 24, 26, 28, 30, 32, 35 ó 38 días de edad, de la cepa CII-ZV, las cuales fueron mantenidas en condiciones controladas de iluminación con 14h de luz y 10h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 horas), con libre acceso a la madre hasta el destete (día 21 de vida) y al alimento y agua desde ese momento hasta el sacrificio.

Procedimiento de autopsia

Los animales se sacrificaron por decapitación, entre las 14:00 y las 15:30 horas. Se disecaron los ovarios y el útero los que se pesaron en balanza de precisión. El peso de los órganos se expresó en miligramos (pesos absolutos). Al momento de la autopsia, también se colectó sangre y se dejó coagular por 30 minutos, se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos y el sobrenadante se almacenó a -20°C, para la posterior cuantificación de LH por radioinmunoanálisis de doble anticuerpo, y de estrógenos y progesterona por radioinmunoanálisis de fase sólida (Salve y col., 1994; Tovar y col., 1984).

En el momento de la autopsia, también se extrajo el cerebro y se colocó en solución salina fría, se extrajo y congeló en nitrógeno líquido y se disecó el hipotálamo anterior, medio y posterior siguiendo las coordenadas del atlas de Paxinos y Watson (1982) (Apéndice A). Estas estructuras se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de NA, DA y 5-HT, así como sus principales metabolitos el ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletilenglicol (MHPG por sus siglas en inglés), el ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC por sus siglas en inglés) y el ácido 5-hidroxíindolacético (5-HIAA por sus siglas en inglés) por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) (Hadfield y col., 1985).

La actividad de la neurona noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica se calculó conforme la relación propuesto por Shannon y col. (1986).

$$\text{Actividad neuronal} = \frac{\text{Concentración del metabolito del neurotransmisor}}{\text{Concentración del neurotransmisor}}$$

Determinación de neurotransmisores y sus metabolitos

En el día del análisis las muestras del hipotálamo anterior medio y posterior se pesaron en una balanza de precisión, se homogeneizaron por sonicación en 300 µl de ácido perclórico (0.1M) en frío y se centrifugaron a 12500 rpm durante 30 minutos a -4°C. El sobrenadante se filtro en papel milipor (poro de 0.2 µm) y 20 µl de éste se inyectó al sistema de cromatografía, para la cuantificación de NA, DA y 5-HT y sus respectivos metabolitos (Apéndice B).

Cuantificación de gonadotropinas, progesterona y estrógenos

La cuantificación de la concentración sérica de LH se realizó por medio de la técnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo (Salve y col., 1994; Tovar y col 1984). A 100 µl de suero, se le agregaron 100 µl de anticuerpo de suero de borrego para LH y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se agregaron 100 µl del segundo anticuerpo (suero normal de coneja) y se incubaron durante 2 horas, después los tubos fueron centrifugados a 3000 rpm a -4°C, finalmente el sobrenadante se decantó, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en un contador de centelleo para el análisis. La concentración de LH se expresó en ng/ml de suero (Apéndice C).

La cuantificación de 17β-estradiol y de progesterona se realizó por radioinmunoanálisis de fase sólida, para lo cual se utilizó un estuche (Coat-A-Count, USA)

que consiste de tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (^{125}I Estradiol y ^{125}I Progesterona) y 7 calibradores para realizar la curva patrón (Progesterona: 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 10.0, 20.0 y 40.0 ng/ml; Estrógenos: 0.96, 5.0, 10.0, 20.0, 50.0, 75.0 y 150.0 pg/ml). A cada tubo se le adicionaron 100 μl de suero problema, más 1000 μl de la hormona marcada, todos los tubos se agitaron y se incubaron a temperatura ambiente durante tres horas. Posteriormente se decantó el sobrenadante de cada tubo, se secaron las paredes del mismo y se colocaron en un contador de centelleo para su análisis. La concentración de progesterona se expresó en ng/ml de suero y la de estrógenos en pg/ml de suero (Salve y col., 1994; Tovar y col., 1984) (Apéndice C).

Estudio de la población folicular

El análisis de la población folicular se realizó en el ovario derecho e izquierdo de tres animales de cada grupo experimental, tomados al azar. Los ovarios fueron fijados en solución de Bouin, deshidratados con alcohol y cloroformo e incluidos en parafina, se realizaron cortes seriados de 10 μm que se tñieron con la técnica de hematoxilina-eosina. Se revisaron todos los cortes y con la ayuda de un ocular micrométrico se midió el diámetro mayor y el perpendicular de este en todos los folículos que presentaron bien definido el núcleo y el nucléolo del ovocito (Fig. 7). Con el valor de los diámetros medidos de cada folículo se calculó el diámetro promedio y se clasificaron según los parámetros propuestos por Hirshfield (1978) en las siguientes categorías: Folículos pequeños (<350 μm de diámetro), folículos medianos (350-499 μm de diámetro) y folículos preovulatorios (>500 μm de diámetro).

Los folículos se consideraron atrésicos cuando presentaron alguna de las siguientes características: picnosis de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa en el antro folicular, engrosamiento de la teca y alteración del ovocito (Greenwald y Roy, 1994).

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos del peso corporal y de los órganos, fueron analizados por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. Los resultados de la distribución de la población folicular se analizaron por la prueba de probabilidad exacta Kruskal Wallis. Los resultados obtenidos de la concentración de neurotransmisores y sus metabolitos, así como la concentración de la LH, 17β -estradiol y progesterona en plasma fueron analizados por la prueba "t" de Student, sólo se consideraron significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue igual o menor a 5%.

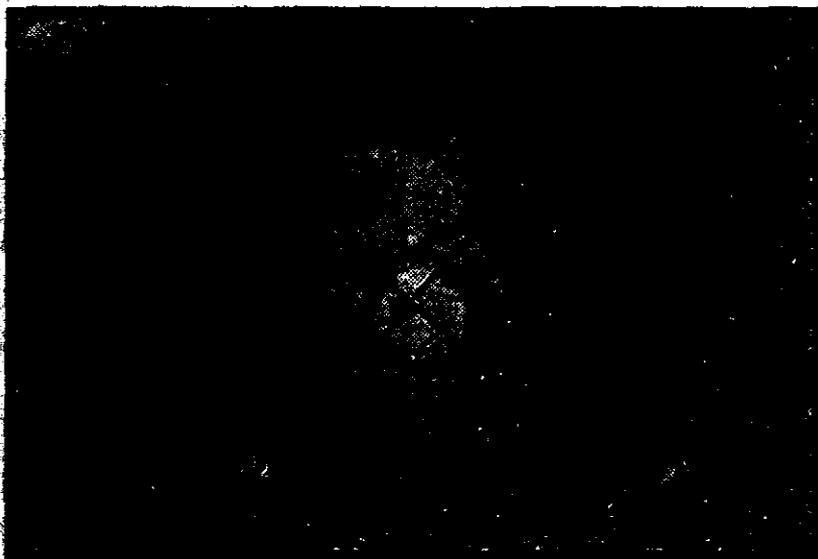


Figura 7. Fotomicrografía de un folículo donde se muestra la medición de los diámetros foliculares. Diámetro promedio = $(D_1 + D_2) / 2$

RESULTADOS

Peso de órganos

En el cuadro 1 se muestran los resultados del peso corporal y de los órganos de los animales sacrificados a diferentes edades, donde se observa el incremento en el peso corporal y la masa ovárica conforme avanza la edad de los animales, y este incremento es más evidente al final de la etapa peripuberal (35 y 38 días). Al inicio de la etapa infantil (10 y 12 días) el peso del útero no presenta diferencias significativas, mientras que el peso del órgano se incrementa a los 14 días y este evento se mantiene conforme avanza la edad del animal. Sin embargo, a los 26 días el peso del útero disminuye, para después incrementar en las edades siguientes y al final de la etapa peripuberal (38 días) se observa el mayor peso de este órgano (cuadro 1 y Fig. 15).

Cuadro 1. Media \pm e.e.m. del peso corporal (PC), masa ovárica (MO) y peso del útero, de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

Edad (días)	n	PC (g)	MO (mg)	Útero (mg)
10	11	23.0 \pm 1.2	8.9 \pm 0.7	3.7 \pm 1.3
12	11	28.9 \pm 0.2	8.3 \pm 0.9	5.6 \pm 0.3
14	10	24.8 \pm 1.1	9.6 \pm 0.9	23.1 \pm 2.0
16	9	34.5 \pm 1.1	10.5 \pm 0.8	30.3 \pm 2.7
18	8	38.7 \pm 1.9	19.0 \pm 2.2	31.7 \pm 2.2
21	10	44.8 \pm 2.7	19.6 \pm 1.1	30.9 \pm 2.9
24	7	54.0 \pm 3.4 *	24.3 \pm 1.2	44.9 \pm 2.9
26	12	56.6 \pm 2.3	25.7 \pm 2.3	41.6 \pm 1.6
28	9	65.0 \pm 1.8	26.3 \pm 1.8	50.3 \pm 2.5
30	11	76.3 \pm 2.2 *	23.7 \pm 1.4	55.5 \pm 3.7
32	11	80.6 \pm 3.5	25.8 \pm 1.5	74.9 \pm 8.6
35	11	95.7 \pm 1.9	26.9 \pm 2.0	87.4 \pm 10.3
38	9	93.8 \pm 1.9	27.4 \pm 2.1	138.3 \pm 20.7

* $p < 0.05$ vs. edad anterior (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

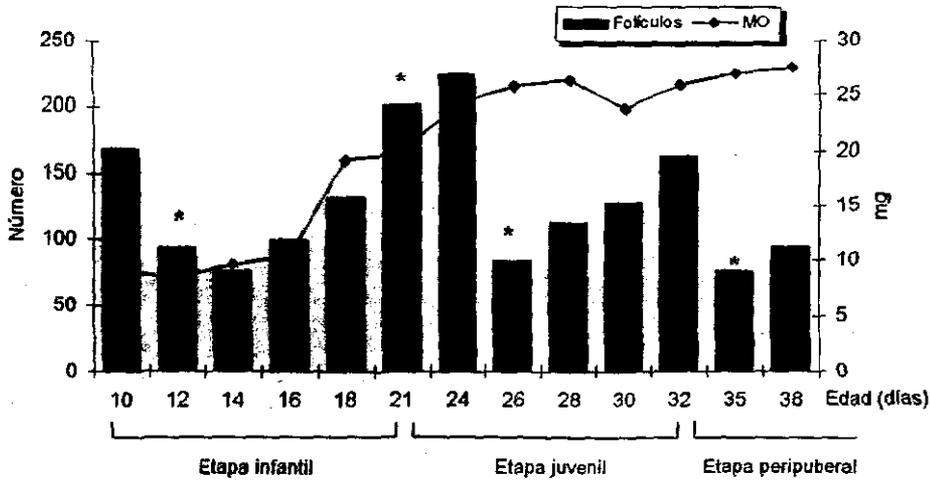
Población folicular

En la cuadro 2 y figura 8 se presenta la media del número de folículos totales presentes en los ovarios de las ratas sacrificadas durante el desarrollo prepuberal. En los ovarios de los animales sacrificados al inicio de la etapa infantil (10 días) se observa un número grande de folículos, mientras que a los 12, 14, 16 y 18 días disminuye y se incrementa al inicio de las etapas juvenil (21 y 24 días) y peripuberal (32 días). En cambio, en las edades restantes nuevamente disminuye la cantidad de folículos totales y el menor número de folículos se observa a los 14 y 35 días de edad. De los 12 a los 24 días se observa una correlación entre el peso del ovario y el número de folículos totales, mientras que en las siguientes edades no se presente esta relación.

Cuadro 2. Número de folículos (media \pm e.e.m.) y su distribución por rango, en los ovarios de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

Edad (días)	Folículos Totales	Folículos < de 350 μ m		Folículos de 350-499 μ m	
		Sanos	Atrésicos	Sanos	Atrésicos
10	163.8 \pm 11.3	159.8 \pm 12.9	8.5 \pm 1.7	-	-
12	94.0 \pm 9.1 *	84.7 \pm 9.5 *	9.3 \pm 2.5	-	-
14	75.3 \pm 9.9	69.7 \pm 9.1	5.7 \pm 1.5	-	-
16	100.3 \pm 6.2	85.0 \pm 5.5	15.3 \pm 1.5 *	-	-
18	132.4 \pm 14.2	108.8 \pm 11.4	21.0 \pm 3.2	1.0 \pm 0.4	1.6 \pm 0.6
21	201.7 \pm 22.2 *	156.0 \pm 17.6 *	37.5 \pm 4.7 *	5.2 \pm 1.4 *	2.7 \pm 0.4
24	224.7 \pm 16.0	180.7 \pm 14.5	32.7 \pm 4.4	5.0 \pm 1.0	6.3 \pm 0.4 *
26	84.0 \pm 19.4 *	59.3 \pm 18.5 *	10.3 \pm 2.0 *	11.8 \pm 1.0 *	2.3 \pm 0.8 *
28	112.3 \pm 21.5	83.0 \pm 16.0	22.3 \pm 4.5 *	4.0 \pm 0.7 *	3.8 \pm 0.7
30	127.0 \pm 4.2	102.3 \pm 4.2	14.8 \pm 1.1	6.8 \pm 1.6	3.2 \pm 1.2
32	162.5 \pm 40.2	132.5 \pm 35.2	15.8 \pm 5.9	6.8 \pm 0.7	3.5 \pm 0.6
35	75.0 \pm 3.4 *	59.3 \pm 2.3 *	6.5 \pm 1.2	4.8 \pm 0.7	3.0 \pm 0.6
38	94.5 \pm 11.1	67.3 \pm 8.6	15.0 \pm 3.5 *	5.0 \pm 1.0	8.3 \pm 1.2 *

* $p < 0.05$ vs. edad anterior (Prueba de Kruskal Wallis).



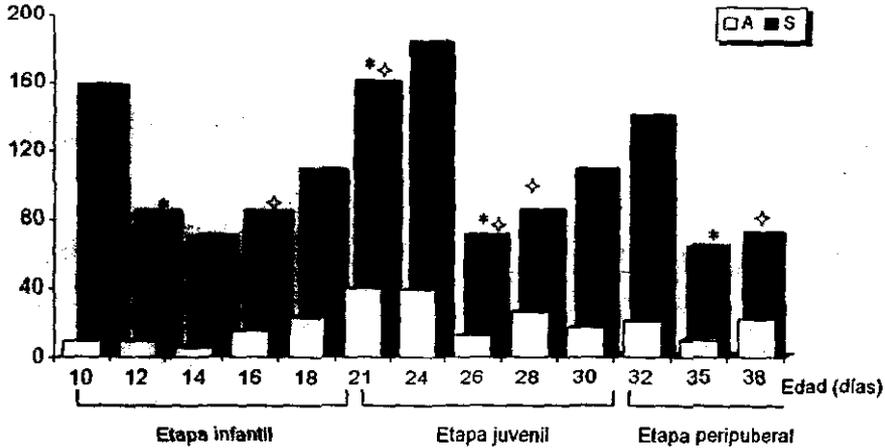
* $p < 0.05$ vs. edad anterior (Prueba de Kruskal Wallis).

Figura 8. Media del número de folículos totales y masa ovárica (MO) de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepupal.

Al analizar el estado de estos folículos (sanos o atresícos), se observa que en los ovarios de los animales de la mayoría de las edades estudiadas predomina la población de folículos sanos. Sin embargo, al final de la etapa infantil (16, 18 y 21 días) e inicio de la juvenil (24 días) el índice de atresia se incrementa, este mismo evento se observa a los 28 y 38 días de edad (Fig. 9).

Al realizar el análisis de la población folicular de acuerdo al diámetro se observa que durante la mayor parte de la etapa infantil (10, 12, 14 y 16 días), sólo se presentan folículos pequeños (Fig. 10 y 12), a partir de los 18 días ya se encuentran folículos medianos (Fig. 10, 12 y 13), mientras que los folículos preovulatorios aparecen a la mitad de la etapa juvenil (26 días) (Fig. 10 y 13). El mayor número de folículos pequeños se presenta en los ovarios de los animales sacrificados a los 10, 21, 24 y 32 días, mientras que en las demás edades el número de folículos es menor. En cuanto a la población de los folículos medianos, se empieza a incrementar conforme se desarrolla el animal, alcanza el valor máximo a los 26 días de edad, y en las siguientes edades disminuye, y nuevamente se incrementa al final de la etapa peripupal (38 días). Los folículos preovulatorios se encuentran presentes en los ovarios de

los animales sacrificados a partir de los 26 días de edad. El mayor número de este tipo de folículos se observa en los ovarios de los animales de 32 y 38 días, mientras que a los 28, 30 y 35 días disminuyen (Fig. 10).

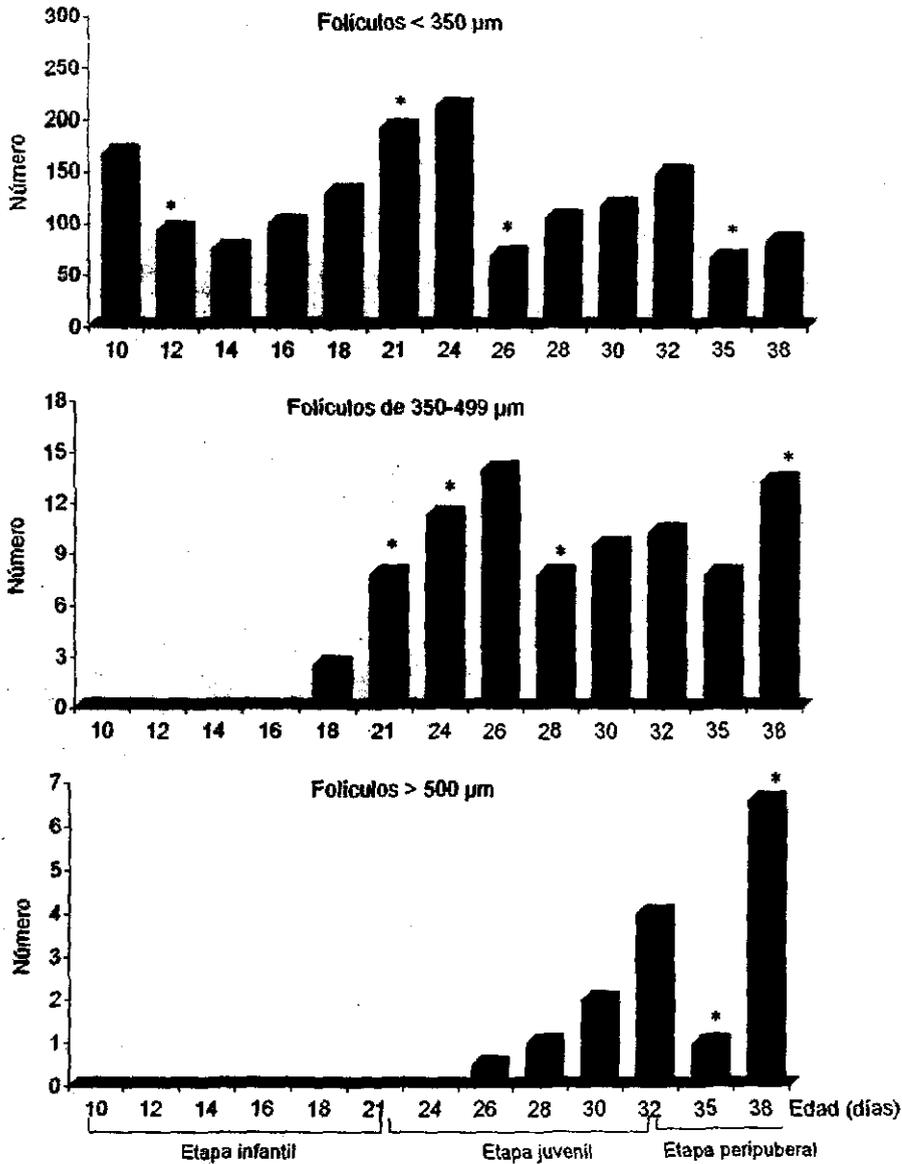


* $p < 0.05$ vs. edad anterior (Prueba de Kruskal Wallis) (folículos sanos)

◊ $p < 0.05$ vs. edad anterior (Prueba de Kruskal Wallis) (folículos atrésicos)

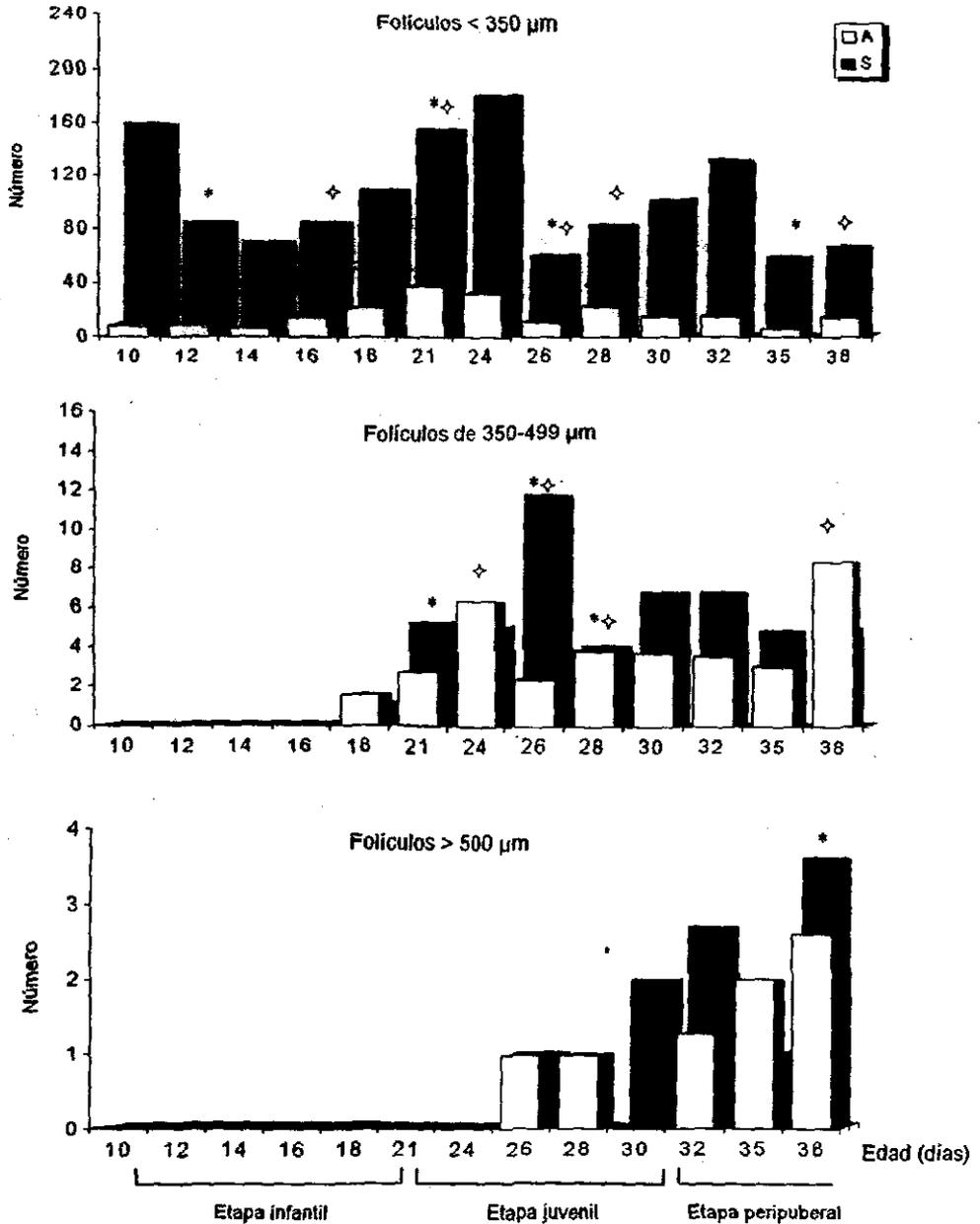
Figura 9. Media del número de folículos sanos (S) y atrésicos (A) presentes en los ovarios de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

La incidencia de atresia en los folículos pequeños es alta a los 16, 18, 21, 24 y 28 días de vida, y a partir de los 16 días se observa una tendencia al incremento en el número de folículos pequeños sanos. Así mismo, el índice de atresia de los folículos medianos es alta en la mayoría de las edades estudiadas, excepto a la mitad de la etapa juvenil (26 días) donde se observan muchos folículos medianos sanos. Considerando el estado de los folículos preovulatorios, se observa que existe un mayor número de folículos sanos al final de la etapa peripuberal (38 días) en relación a las otras edades estudiadas (Fig. 11 y 13).



* $p < 0.05$ vs. edad anterior (Prueba de Kruskal Wallis)

Figura 10. Media del número de folículos por rango presentes en los ovarios de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.



* $p < 0.05$ vs. edad anterior (Prueba de Kruskal Wallis) (foliculos sanos)

◊ $p < 0.05$ vs. edad anterior (Prueba de Kruskal Wallis) (foliculos atrésicos)

Figura 11. Número de foliculos sanos (S) y atrésicos (A), presentes en los ovarios de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepupal.

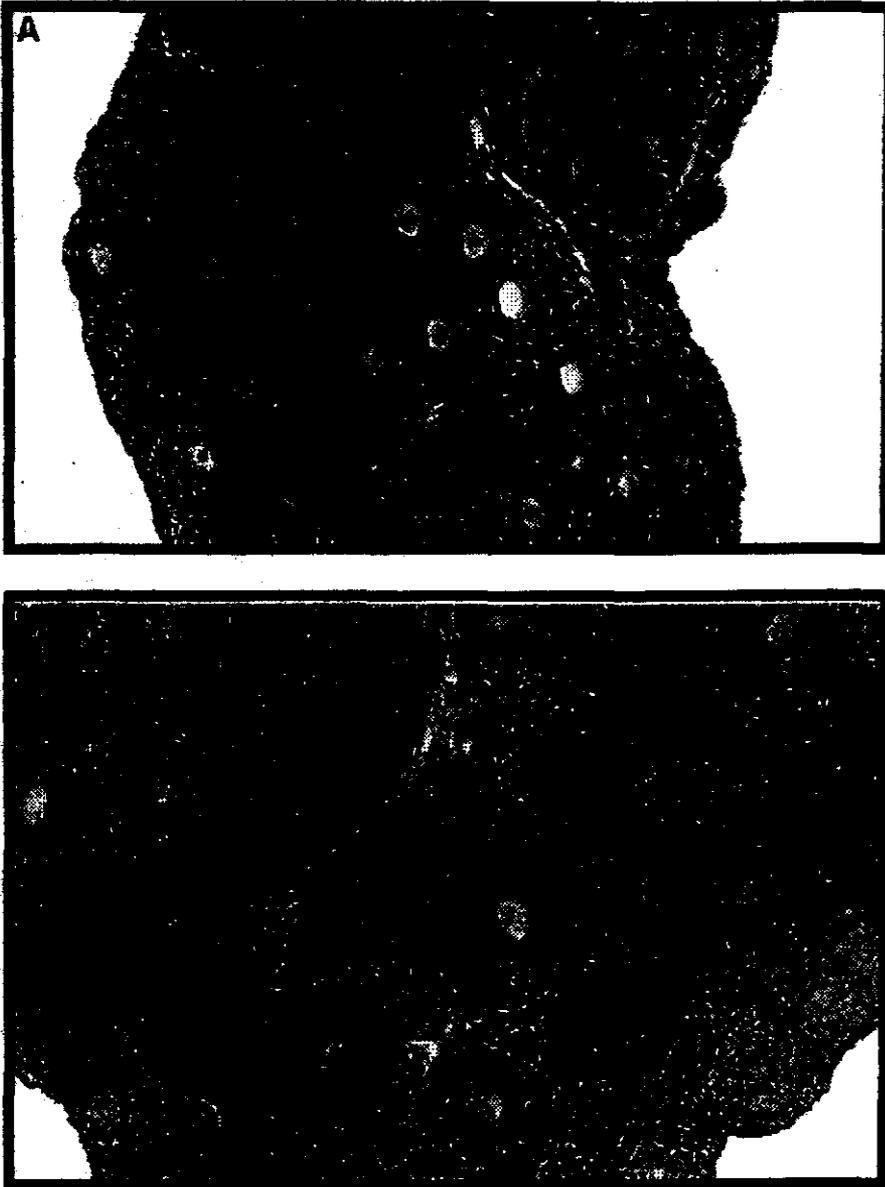


Figura 12. Fotomicrografía de cortes histológicos de 10 μm de ovarios de ratas. A) ovario de rata de 12 días, en el que se observan folículos primordiales y pequeños, los cuales son característicos de la etapa infantil (40 x); B) ovario de rata de 21 días, se muestran folículos pequeños y medianos, en algunos aparecen pequeñas lagunas de líquido folicular, este tipo de folículos predominan al inicio de la etapa juvenil (40 x).

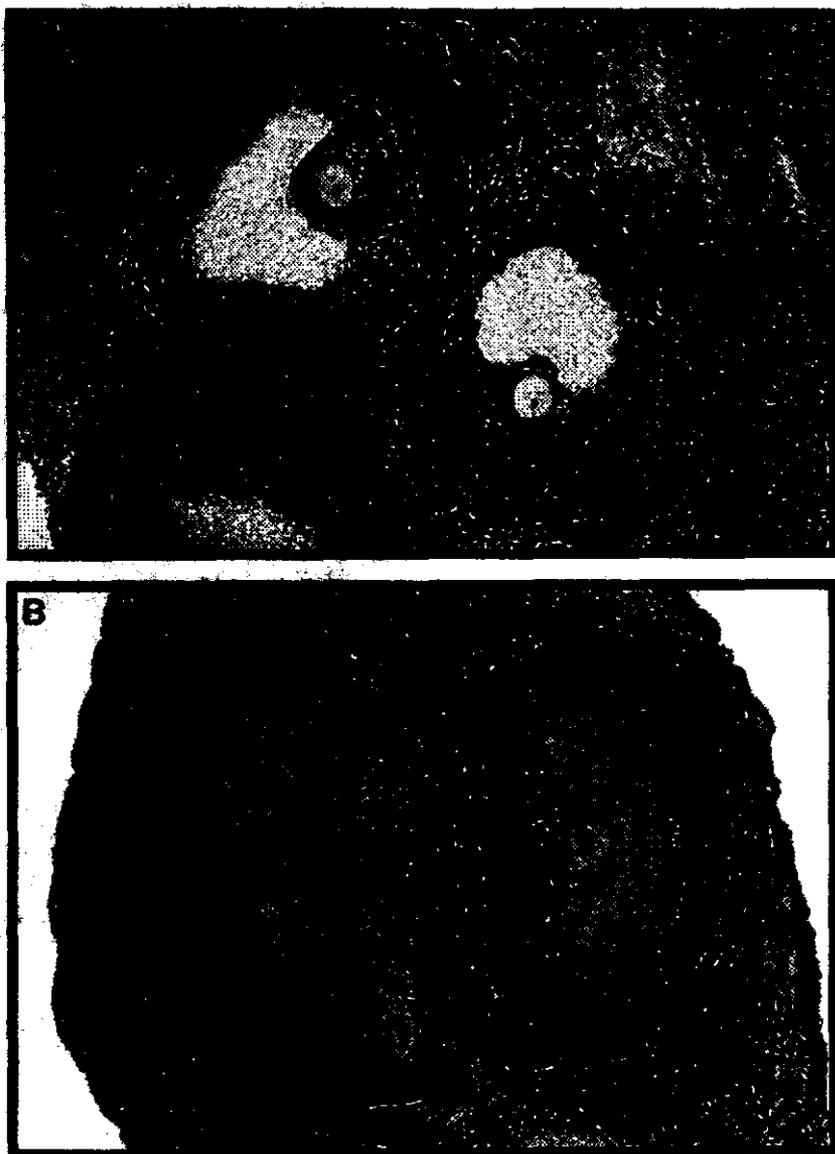


Figura 13. Fotomicrografía de cortes histológicos de 10 μ m de ovarios de rata. A) ovario de rata de 26 días, se observan folículos medianos que presentan un antro de mayor tamaño, este tipo de folículos predominan al final de la etapa juvenil (40 x); B) ovario de rata de 38 días, se observan dos folículos preovulatorios sanos (40 x).

Patrón de secreción de la LH y concentración de estrógenos y progesterona en suero

En la figura 14 se muestra el comportamiento en la secreción de la LH durante el desarrollo prepuberal de la rata, a la mitad de la etapa infantil (14-16 días) se observa un pico de secreción de esta hormona, mientras que en las siguientes edades permanece baja y tiende a incrementarse al final de la etapa peripuberal (38 días).

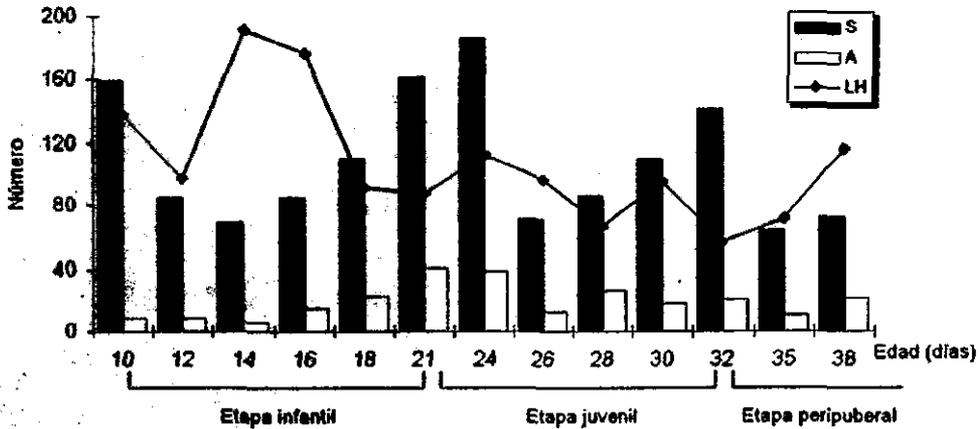
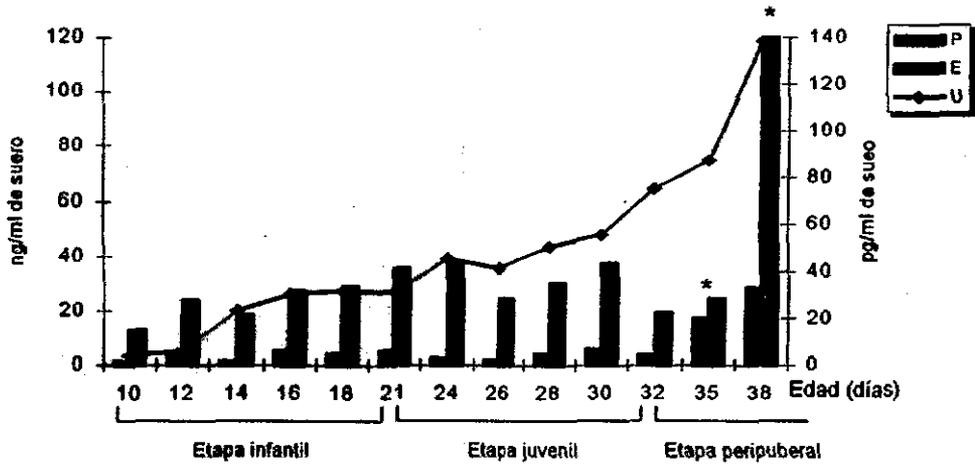


Figura 14. Comportamiento de la secreción de la LH a lo largo del desarrollo prepuberal de la rata.

En la figura 15 se muestra la concentración sérica de progesterona y estrógenos durante el desarrollo prepuberal de la rata, se observa que la concentración de progesterona es baja durante todo el desarrollo del animal, mientras que al final de la etapa peripuberal (35 y 38 días) se incrementa de manera significativa respecto a las otras edades. La concentración de estrógenos tiende a aumentar conforme el animal se desarrolla hasta los 24 días de edad, en la edad posterior nuevamente disminuye y se incrementa a los 28 y 30 días, sin embargo estos cambios no son estadísticamente significativos. Mientras, que al final de la etapa peripuberal (38 días) la concentración de estrógenos aumenta de manera significativa respecto a las edades anteriores. Durante la etapa infantil (14, 16, 18 y 21 días) e inicio de la juvenil (24 días), existe una correlación entre la concentración sérica de estrógenos y el peso

del útero y esta relación es más evidente al final de la etapa peripuberal (38 días).



* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student).

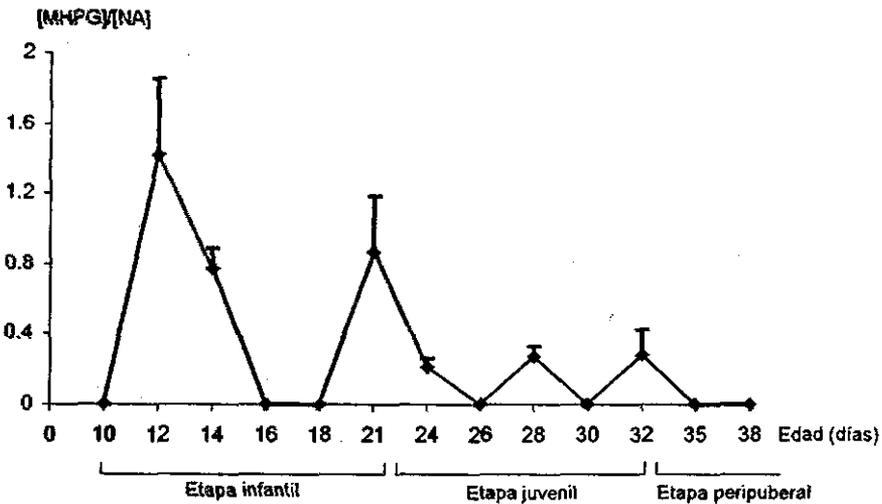
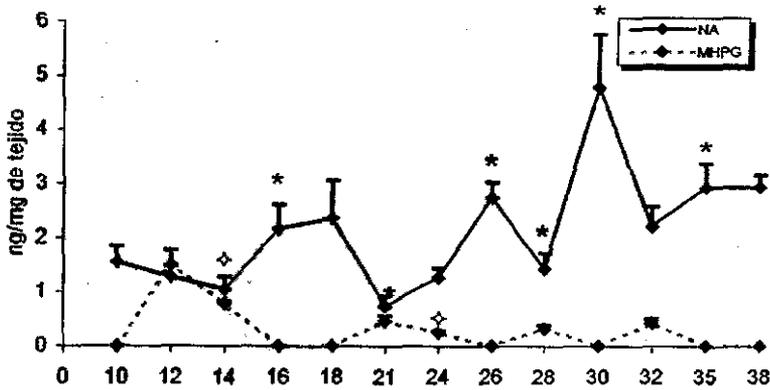
Figura 15. Media \pm e.c.m. de la concentración sérica de 17β -estradiol (E), progesterona (P) y peso del útero (U) (mg) de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

Sistema noradrenérgico

En los resultados se observa que la concentración de NA en el hipotálamo anterior aumenta al final de la etapa infantil (16 y 18 días), mientras que en la etapa juvenil se observan dos picos de secreción de este neurotransmisor (26 y 30 días), en los días previos a la pubertad (35 y 38 días) la concentración de NA es similar a la observada al final de la etapa infantil (Fig. 16). En el hipotálamo medio los cambios en la concentración de este neurotransmisor, durante las etapas juvenil y peripuberal son similares a los observados en el hipotálamo anterior (Fig. 17). En el hipotálamo posterior la concentración de NA es constante durante la etapa infantil, mientras que durante la fase juvenil se presentan dos picos de secreción (26 y 30 días). A los 24, 28 y 32 días la concentración se encuentra por debajo de la sensibilidad del método (0.01 ng) (Fig. 18).

La concentración del metabolito de la noradrenalina el MHPG en el hipotálamo anterior y medio es mayor al inicio de la etapa infantil (12 y 14 días), mientras que en las edades restantes se mantiene baja (Fig. 16 y 17). En cambio, en el hipotálamo posterior la mayor concentración del MHPG se observa a los 10, 12, 14, 28 y 32 días de edad (Fig. 18).

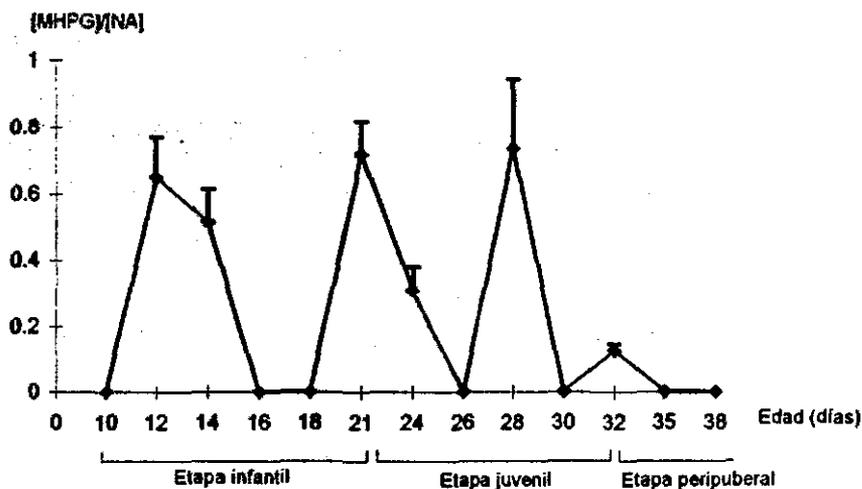
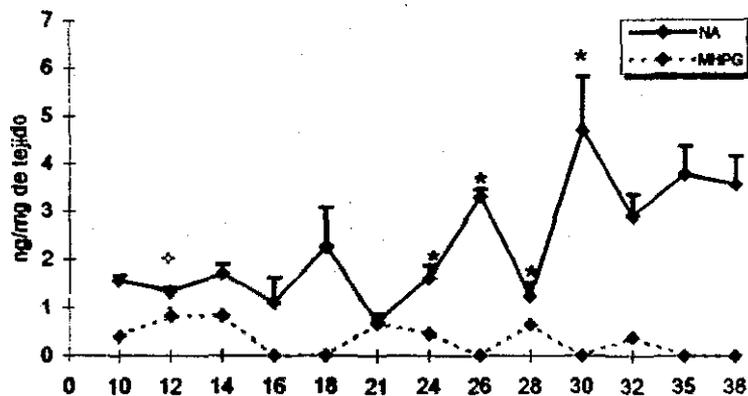
En el hipotálamo anterior y medio se observan dos picos de actividad del sistema noradrenérgico durante la fase infantil (12 y 21 días), uno en la etapa juvenil (28 días) y otro en la peripuberal (32 días), mientras que en el resto de las edades la actividad disminuye (Fig. 16 y 17). En el hipotálamo posterior también se presentan cuatro picos de actividad de la neurona noradrenérgica a los 12, 14, 21 y 26 días de edad (Fig. 18).



* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student) (NA).

◇ $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student) (MHPG).

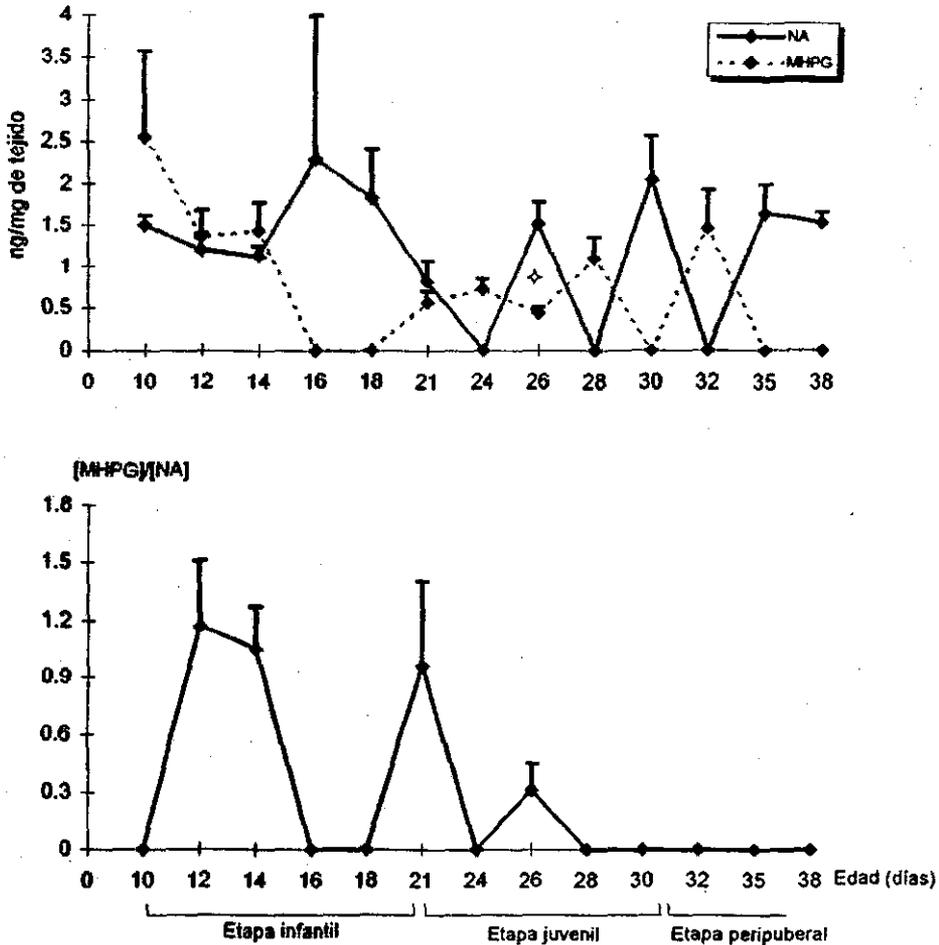
Figura 16. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), del ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletínglico (MHPG) y la actividad de la neurona noradrenérgica ([MHPG]/[NA]) en el hipotálamo anterior de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.



* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student).

◇ $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student) (MHPG).

Figura 17. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), del ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y la actividad de la neurona noradrenérgica ([MHPG]/[NA]) en el hipotálamo medio de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.



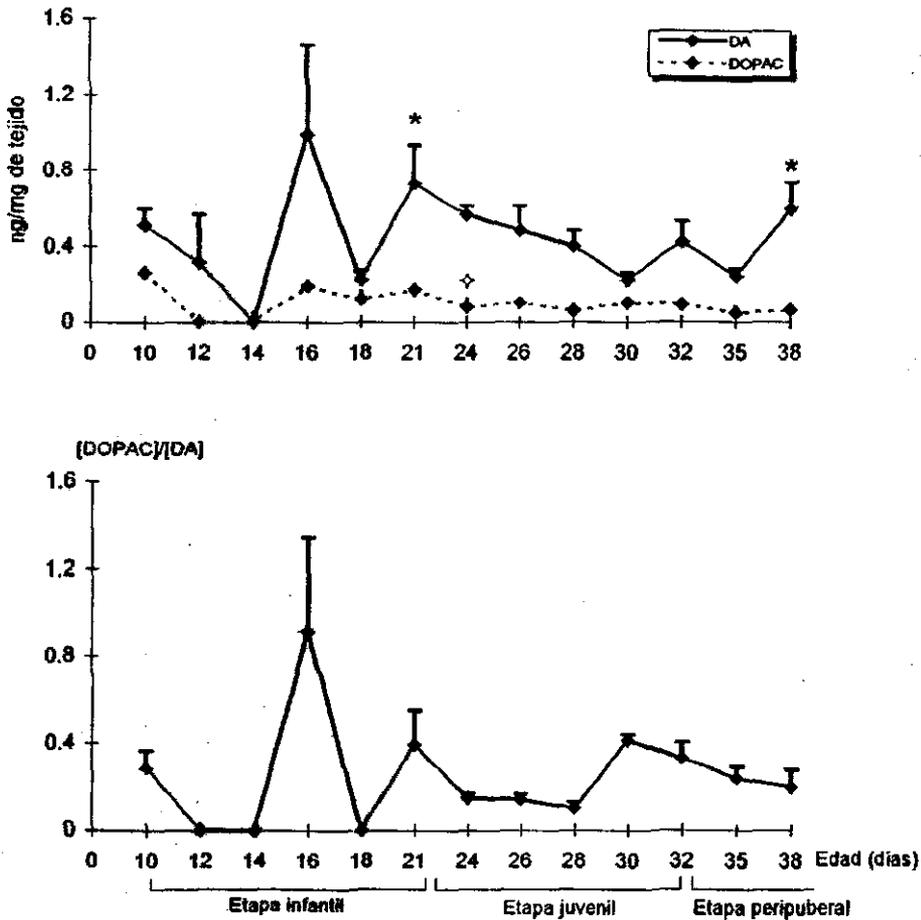
* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student).

Figura 18. Media \pm e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), del ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletilenglicol (MHPG) y la actividad de la neurona noradrenérgica ([MHPG]/[NA]) en el hipotálamo posterior de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

Sistema dopaminérgico

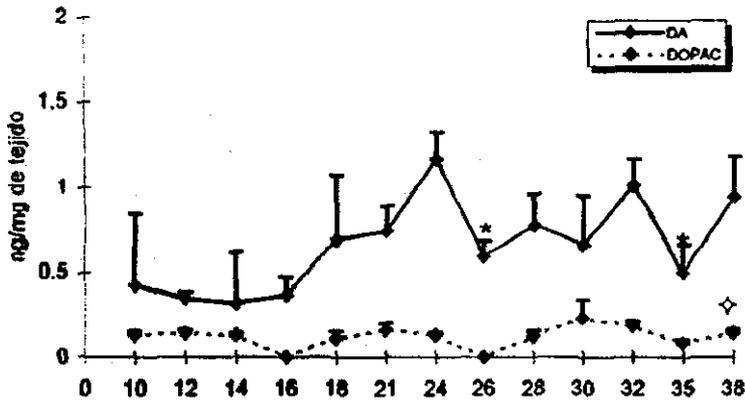
En las figuras 19, 20 y 21 se muestran los cambios en la concentración de dopamina, del metabolito (DOPAC), así como la actividad de la neurona dopaminérgica en el hipotálamo anterior, medio y posterior durante el desarrollo prepuberal de la rata. En el hipotálamo anterior se observa una mayor concentración de la DA en la parte media y al final de la fase infantil (16 y 21 días) y en las siguientes edades permanece baja, mientras que al final de la etapa peripuberal (38 días) nuevamente aumenta (Fig. 19). En el hipotálamo medio la concentración de este neurotransmisor es baja durante la etapa infantil y se incrementa al final de la misma (18 y 21 días) y alcanza la máxima concentración al inicio de la etapa juvenil (24 días), en las edades siguientes disminuye y se mantienen constante (Fig. 20). La concentración de dopamina en el hipotálamo posterior presente cambios similares a los observados en el hipotálamo medio, sin embargo la máxima concentración de este neurotransmisor se observó hasta los 26 días, y a los 28 y 30 días la concentración estuvo por debajo de la sensibilidad del método (Fig. 21). En el hipotálamo anterior, medio y posterior la concentración del DOPAC es baja en todas las edades estudiadas (Fig. 19, 20 y 21).

Durante la etapa infantil, se observan dos picos de actividad en el hipotálamo anterior (16 y 21 días) (Fig. 19). En el hipotálamo medio la actividad de este sistema de neurotransmisión fue mayor a los 14 y 28 días de edad, mientras que en el resto de las edades disminuyó (Fig. 20). Por otra parte, en el hipotálamo posterior se observa una gran actividad de la neurona dopaminérgica al inicio de la fase infantil (12 días), en la siguiente edad disminuye y se incrementa al final de esta etapa (16 a los 21 días), para disminuir nuevamente en la etapa juvenil y aumentar al inicio de la peripuberal (32 días) (Fig. 21).

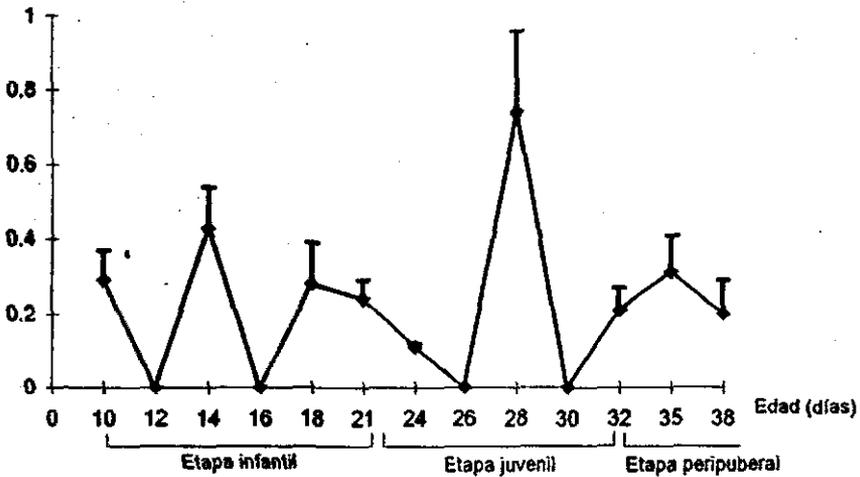


* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student).

Figura 19. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de dopamina (DA), del ácido 3,4-hidroxifenilacético y la actividad de la neurona dopaminérgica ([DOPAC]/[DA]) en el hipotálamo anterior de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.



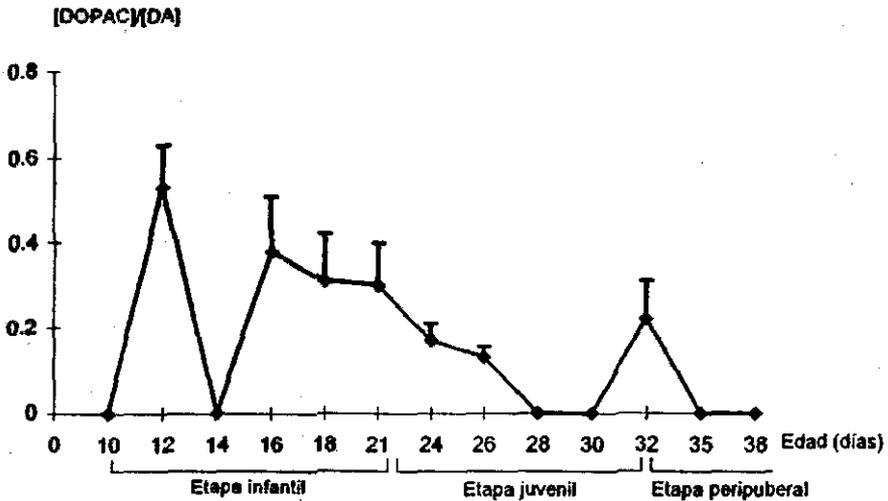
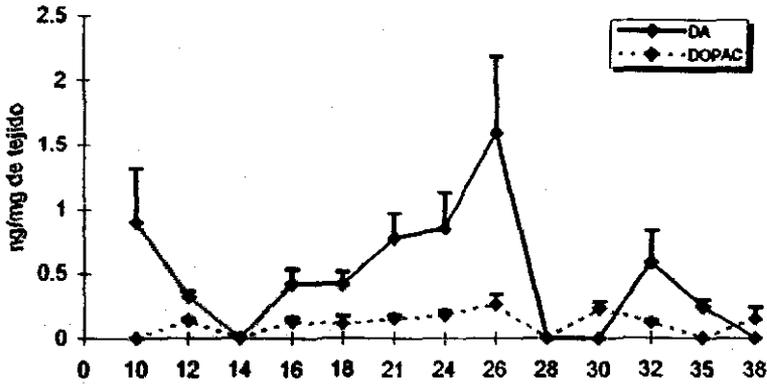
[DOPAC]/[DA]



* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student) (DA).

◇ $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student) (DOPAC).

Figura 20. Media \pm e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de dopamina (DA), del ácido 3,4-hidroxifenilacético y la actividad de la neurona dopaminérgica ([DOPAC]/[DA]) en el hipotálamo medio de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.



* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student).

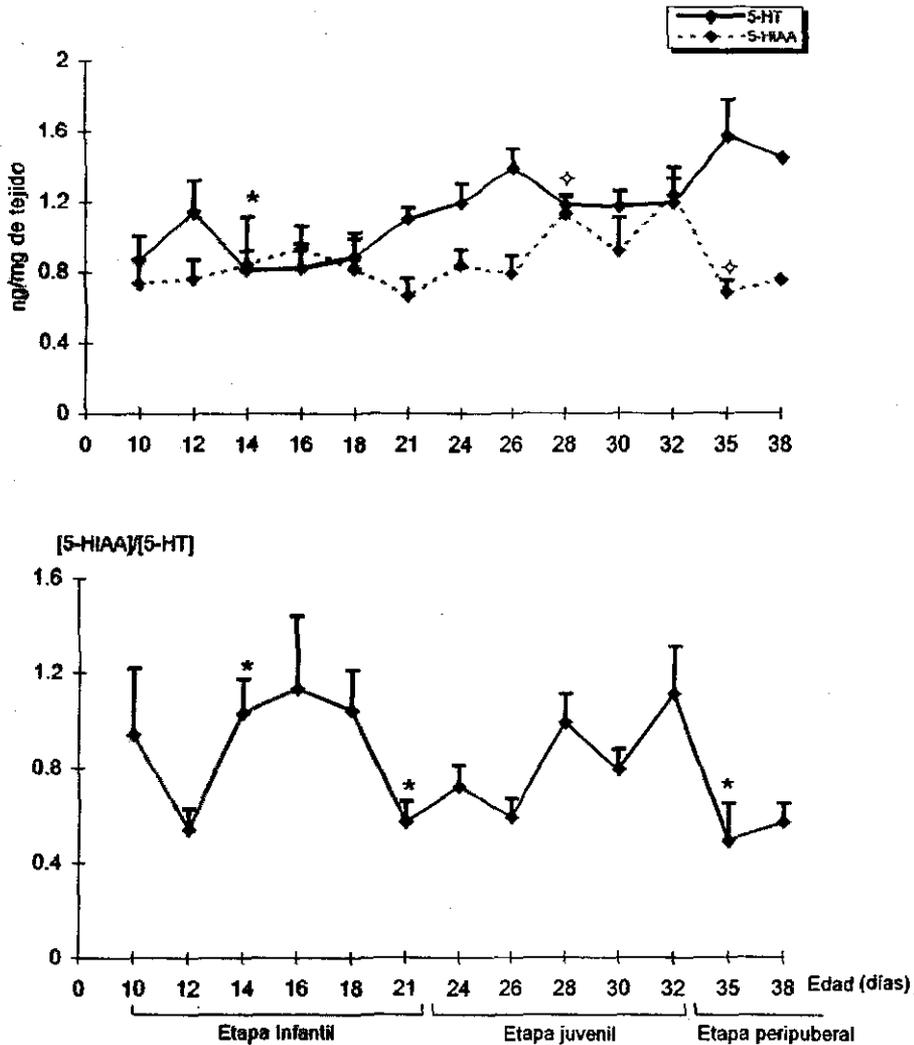
Figura 21. Media \pm e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de dopamina (DA), del ácido 3,4-hidroxifenilacético y la actividad de la neurona dopaminérgica ([DOPAC]/[DA]) en el hipotálamo posterior de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

Sistema serotoninérgico

En los resultados se observa que en el hipotálamo anterior la concentración de este neurotransmisor es alta al inicio de la etapa infantil (12 días), mientras que a los 14 días se presenta una disminución significativa y se mantiene constante durante el resto de la etapa. Durante la etapa juvenil y peripuberal, la concentración de la 5-HT tiende a aumentar (Fig. 22). Durante la mayor parte de la etapa infantil la concentración de este neurotransmisor en el hipotálamo medio es baja, con excepción de los 18 días puesto que en esta edad aumenta y en las siguientes etapas disminuye y se mantiene constante (Fig. 23). En el hipotálamo posterior la concentración de serotonina no presenta cambios durante la etapa infantil y en la juvenil y peripuberal aumenta gradualmente y la mayor concentración se observa a los 26 y 38 días de edad (Fig. 24).

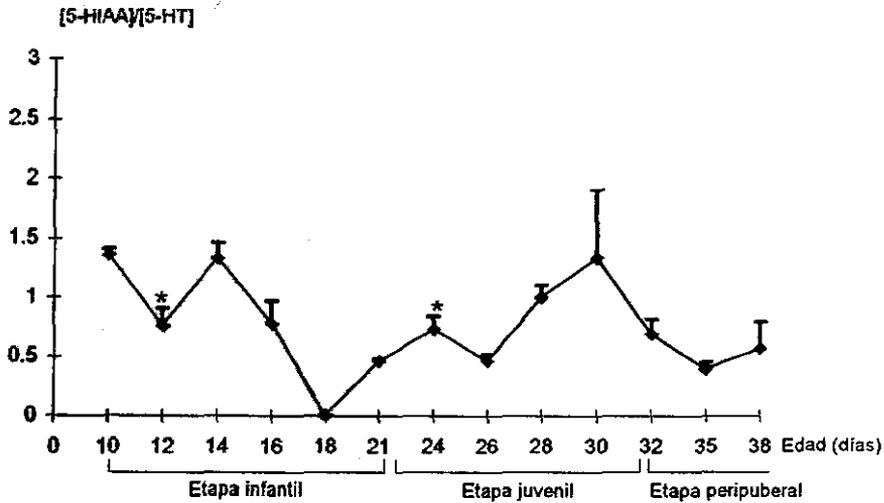
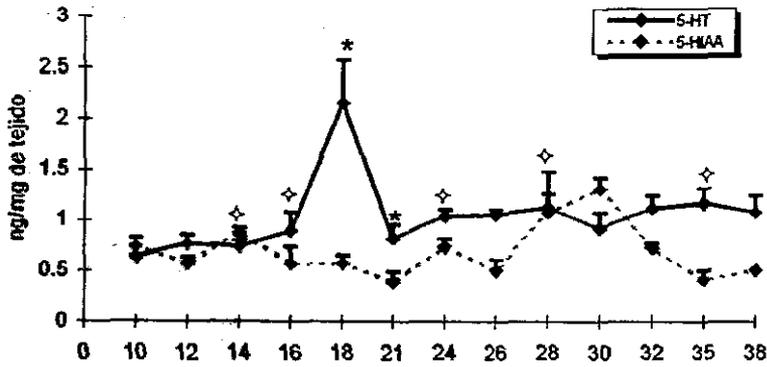
La concentración del 5-HIAA en el hipotálamo anterior es alta durante la mayor parte del desarrollo prepuberal, excepto en los días previos a la pubertad (35 y 38 días) donde se observa que disminuye (Fig. 22). En el hipotálamo medio la concentración de este metabolito es muy similar a la concentración del neurotransmisor durante el inicio de la etapa infantil (12, 14 y 16 días), sin embargo su concentración permanece constante durante las fases infantil e inicio de la juvenil (10 a los 26 días), al final de la etapa juvenil aumenta la concentración de 5-HIAA y disminuye en la peripuberal (Fig. 23). En el hipotálamo posterior se observa que durante la mayor parte de la etapa infantil (10, 12, 14, 16 y 18 días) la concentración del metabolito es igual a la del neurotransmisor. Mientras que, en las siguientes etapas es menor (Fig. 24).

En el hipotálamo anterior y posterior se observa un comportamiento similar en la actividad de la neurona serotoninérgica. Durante la etapa infantil la actividad de este sistema es alta (10, 12, 14, 16 y 18) y disminuye en las siguientes etapas (Fig. 22 y 24). En cambio, en el hipotálamo medio la actividad de la neurona serotoninérgica es mayor a los 14 y 24 días y en las otras edades estudiadas es baja (Fig. 23).



* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student).

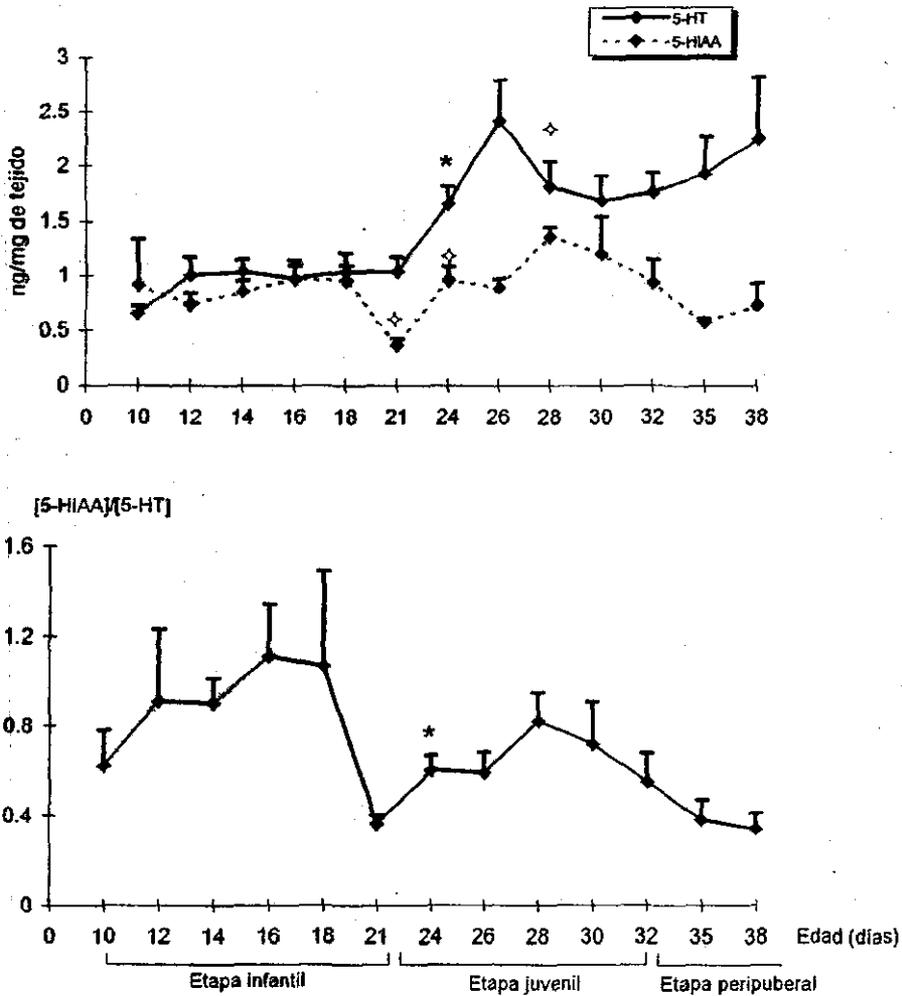
Figura 22. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y la actividad de la neurona serotoninérgica ([5-HIAA]/[5-HT]) en el hipotálamo anterior de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.



* $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student) (5-HT).

◇ $p < 0.05$ vs. edad anterior ("t" de Student) (5-HIAA).

Figura 23. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y la actividad de la neurona serotoninérgica ([5-HIAA]/[5-HT]) en el hipotálamo medio de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.



* $p < 0.05$ vs. edad anterior (t de Student).

Figura 24. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxi-indolacético (5-HIAA) y la actividad de la neurona serotoninérgica ([5-HIAA]/[5-HT]) en el hipotálamo posterior de ratas sacrificadas a diferentes edades del desarrollo prepuberal.

DISCUSIÓN DE RESULTADOS

Los resultados obtenidos en el presente estudio permiten sugerir que durante el desarrollo prepuberal de la rata se producen cambios significativos en la actividad de los sistemas noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico del hipotálamo, que están vinculados con el desarrollo de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas y el crecimiento y maduración del folículo ovárico. Así mismo, muestran que durante el desarrollo prepuberal de la rata se presentan ondas de crecimiento y atresia folicular, como ya ha sido planteado previamente (Ojeda y Urbanski, 1994).

En este estudio se observó que el peso corporal de la rata se incrementa con la edad del animal, esto concuerda con lo descrito por otros autores (Araki y col., 1975, Ojeda y Jamenson, 1977; Hirshfield, 1994). El aumento en peso del animal es más evidente a partir de la fase juvenil (24 días), este evento posiblemente este asociado a la mayor secreción de la GH. En apoyo a esta interpretación Ojeda y Jamenson (1977) y Ojeda y Urbanski (1994), mostraron que durante la fase neonatal e infantil (desde el nacimiento hasta los 21 días de vida), la concentración plasmática de la GH es baja, pero al final de esta etapa se incrementa con relación a las edades previas, lo cual se traduce en una mayor tasa de crecimiento del animal. Así mismo, Ojeda y Jamenson (1977) observaron que durante el desarrollo peripuberal (días previos a la pubertad), la concentración de la GH es más alta, lo que explica que durante la etapa peripuberal (32, 35 y 38 días) sea más evidente el incremento en peso del animal (Cuadro 1).

Existe una relación entre la concentración de la GH y el crecimiento de los animales (Ramaley, 1979; Goodman 1995; Bowres y col., 1991). Se ha mostrado, que la GH estimula el crecimiento y el desarrollo somático posnatal y cuando existe deficiencia en la producción de esta hormona en niños y animales jóvenes, estos crecen a una velocidad mucho menor y la maduración sexual se retrasa, la masa corporal magra disminuye, mientras que la masa grasa aumenta (Ramaley, 1979; Genuth, 1993). En apoyo a lo antes mencionado, se ha mostrado que la deficiencia de GH en los humanos durante la etapa infantil detiene el crecimiento o

provoca enanismos (Goodman y col., 1995). Mientras que, en la rata la administración del factor liberador de la hormona de crecimiento (GHRP) incrementa el peso corporal (Bowres y col., 1991).

Los resultados de este estudio muestran que el peso del ovario aumenta durante el desarrollo prepuberal de la rata y corrobora lo ya observado por otros autores (Ojeda y Ramirez, 1972; Araki y col., 1975). En nuestros animales este incremento es más evidente al final de la etapa infantil (18 días). Este hecho posiblemente está vinculado con un mayor desarrollo folicular, ya que a partir de esta edad en el ovario se observó el aumento en el número de folículos totales y además aparecen los folículos de tamaño mediano (Fig. 8 y 10). Esta idea concuerda con lo reportado por Knudsen y col. (1974, citado en Byskov 1978), quienes mostraron que el aumento del peso del ovario está asociado con el aumento en el número de folículos antrales grandes y un mayor peso del útero.

En cambio, al final de la etapa juvenil y peripuberal no se observa una correlación entre el peso del ovario y el número de folículos, posiblemente debido a que durante esta parte del desarrollo del animal el incremento en peso del órgano es el resultado de otros compartimentos como es el intersticial, esta idea es apoyada por las evidencias que señalan que la teca de los folículos atrésicos origina a la glándula intersticial (Dominguez y col. 1991, Greenwald y Roy, 1994), y en nuestro estudio se observó que en la parte media de la etapa infantil y al final de la juvenil aumenta el índice de atresia.

Conforme avanza el desarrollo del animal también observamos el aumento del peso del útero (Fig. 15), este evento posiblemente está vinculado a la mayor producción de estrógenos por parte del folículo ovárico, ya que como se ha descrito a medida que el folículo crece este adquiere la capacidad de secretar mayor cantidad de estrógenos en respuesta a la acción de las gonadotropinas (Dominguez y col., 1991; Greenwald y Roy, 1994 y Ojeda y Urbanski, 1994). La idea de que los estrógenos inducen el aumento de peso del útero es apoyada por las evidencias que señalan que las hormonas ováricas promueven una serie de eventos fisiológicos tales como su acción mitogénica sobre las células epiteliales, desarrollo

del endometrio y la acumulación de líquido en el lumen del útero (Finn y Booth, 1977, Feder 1981; Domínguez y col., 1991). Cuando disminuye la secreción de estrógenos se observa la atrofia del útero y su administración, revierte este evento (Finn y Booth, 1977). En conjunto estas evidencias señalan que las hormonas ováricas son esenciales para mantener el crecimiento de este órgano.

Sin embargo, el aumento en peso del útero observado entre los 26 y 35 días de edad no se correlaciona con la concentración de estrógenos en suero (Fig. 15), este evento posiblemente está vinculado a la participación de otras hormonas como la progesterona y factores como el IGF-I y EGF, cuya secreción y aparición de sus receptores es regulada por los estrógenos. Además, el IGF-I estimula la mitosis en varios tejidos y se ha mostrado que el útero posee receptores para dicho factor, mientras que el EGF tiene efectos similares a los estrógenos en el desarrollo del del órgano (Brenner y Slayden, 1994).

El incremento más evidente del órgano al final de la etapa infantil y el mayor peso en los días previos a la apertura vaginal (día 38), coincide con la alta concentración de 17β -estradiol observada en estas etapas (Fig. 15). Otro aspecto a considerar es que se ha mostrado que al final de la fase infantil la concentración de α -fetoproteína, que se une fuertemente a los estrógenos e impide que estos ejerzan su acción biológica, disminuye de forma gradual conforme avanza la edad del animal (Ojeda y Urbanski, 1994), lo cual se traduce en el mayor desarrollo del órgano observado en este estudio. En conjunto nuestros resultados y los de otros autores (Finn y Booth, 1977; Feder, 1981; Domínguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994), apoyan la idea de que los cambios en el peso del útero están asociados a los de las hormonas esteroides ováricas y los factores de crecimiento.

Se ha descrito que el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos son regulados por las gonadotropinas, esteroides ováricos y los factores de crecimiento. Los folículos que inician su crecimiento siguen dos caminos: crecer y llegar a ovular o entrar al proceso de atresia. (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994). En nuestro caso el análisis

de la población folicular indica que durante el desarrollo prepuberal se presentan ondas de desarrollo y atresia.

Se ha observado, que el tiempo que tarda un folículo en llegar a las etapas de atresia avanzada y desaparecer del ovario, depende de su tamaño y de la especie en estudio. En el ovario de la coneja un folículo grande atrésico tarda en ser reabsorbido 7 días aproximadamente (Hill y White, 1933 citado en Byskov 1978). Mientras que, en el ovario del ratón los folículos atrésicos perduran de 8 a 10 días (Peters y Levy 1966 citado en Byskov 1978). Con base en estas evidencias es posible pensar que en las edades donde disminuye el número de folículos sanos y no se observa el aumento en el índice de atresia, posiblemente se deba a que únicamente se tomaron en cuenta los folículos en las primeras etapas de atresia, (folículos con núcleo y nucléolo en el ovocito) y no se consideraron los folículos en atresia avanzada (folículos sin ovocito), los cuales aun se encuentran en el ovario y se integran al compartimento intersticial.

El mayor número de folículos con diámetro menor a 350 μm observado en los ovarios de los animales sacrificados al inicio de la etapa infantil (10 días) (Fig. 10), posiblemente no se debe exclusivamente a la acción de la FSH, dado que se señala que durante la etapa neonatal, la concentración de esta hormona es baja y comienza a aumentar al final de la misma (Döhler y Wuttke, 1974, 1975; Ojeda y Urbanski, 1994). Sin embargo, no se puede excluir la participación de la FSH en el crecimiento del folículo a esta edad, debido a que se ha mostrado que cuando se bloquea la liberación de la GnRH y la FSH en la etapa neonatal se retrasa el crecimiento folicular (Van Campellen y col., 1989). Otro evento que posiblemente contribuyó al aumento en el número de folículos pequeños en esta edad es el TGF α , dado que se señala que la concentración de este factor aumenta al final de la etapa infantil (Ojeda y Urbanski, 1994) y su función en el ovario es estimular la proliferación de las células de la granulosa y como consecuencia el desarrollo del folículo (Skinner y Parrott, 1994).

Es posible que la baja concentración de gonadotropinas durante la etapa neonatal (Döhler y Wuttke, 1974, 1975; Ojeda y Urbanski, 1994), se refleje en la disminución en el número de folículos pequeños sanos en la etapa infantil (12 y 14 días), lo que nos permite pensar que a estas edades se presentó un alto índice de atresia folicular (Fig. 25). Es posible que la concentración de gonadotropinas a los 10 días de edad es insuficiente para mantener el crecimiento de los folículos que iniciaron su desarrollo durante la etapa neonatal, como consecuencia la mayoría de estos sufren atresia, lo que se traduce en la disminución de los folículos sanos observado en la mayor parte de la etapa infantil (12, 14 y 16 días) y posiblemente tal evento está vinculado al aumento del índice de atresia, que en esta etapa no se observe, debido a que únicamente se consideraron los folículos en etapas iniciales de atresia (Fig. 11). Esta idea es apoyada por las evidencias que señalan, que cuando los folículos son expuestos a la FSH no se manifiesta el proceso de atresia y continúan su desarrollo hasta alcanzar la etapa de folículos preovulatorios, así mismo la administración de los estrógenos induce el desarrollo folicular debido a su acción mitogénica en las células de la granulosa (Greenwald y Roy, 1994, 1994; Hsueh y col., 1994).

En los resultados de este estudio se observa que durante el aumento del índice de atresia folicular la concentración de estrógenos permanece baja (Fig. 25). Una posible explicación, a este hecho sería que en los folículos atrésicos está disminuida la secreción de esta hormona, ya que como se ha descrito la atresia es un evento asociado a la disminución en la actividad de la enzima aromatasas y como consecuencia aumenta la concentración de los andrógenos (androstenediona y testosterona principalmente) (Ramaley, 1979; Greenwald y Roy, 1994), como ya se ha mostrado que ocurre en la etapa infantil (Döhler y Wuttke, 1975). Así mismo, se ha descrito que los andrógenos inhiben la actividad de la aromatasas y su administración a ratas hipofisectomizadas tratadas con estrógenos, incrementa el número de células picnoticas en la granulosa e induce la degeneración del ovocito (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994).

Es posible que esta alta concentración de andrógenos durante la etapa infantil, este vinculada a la mayor secreción de la LH al inicio de esta etapa observada en nuestros

resultados (Fig. 14 y 25). Esta idea es apoyada por el hecho de que la LH induce la transformación de progesterona a andrógenos, los cuales posteriormente son aromatizados en las células de la granulosa. Sin embargo, se ha mostrado que en los ovarios de las ratas neonatales, donde predominan los folículos pequeños, la producción de estrógenos es baja (Ramaley, 1979; Gore-Langton y Armstrong 1994). En conjunto, estas evidencias nos permiten sugerir que los andrógenos secretados por la acción de la LH, no son aromatizados rápidamente, por lo que se acumulan e inducen atresia folicular. Esta idea es apoyada por nuestros resultados, donde se observa baja concentración de estrógenos al inicio de la etapa infantil, es posible que esto se deba principalmente a que en los ovarios de estos animales predomina los folículos pequeños sin atro. Se señala que durante la etapa neonatal el compartimento intersticial es la principal fuente de hormonas esteroides debido a que en estas células se ha detectado actividad de la Δ^5 -3 β -dihidroxiesteroide deshidrogenasa. Sin embargo, no se puede descartar la participación de los folículos preantrales dado que poseen receptores a la FSH. Con base en estas evidencias experimentales, es posible sugerir que la producción de estrógenos durante la fase neonatal e infantil, se lleva acabo por la participación entre los folículos preantrales y las células intersticiales, como ya ha sido planteado previamente (Ramaley, 1979; Gore-Langton y col., 1994).

La alta concentración de LH, observada durante la etapa infantil se debe a varios factores, uno de ellos es que durante esta etapa la sensibilidad de la hipófisis a la GnRH aumenta, lo cual esta vinculado a un mayor número de receptores a la misma. Así mismo, el mecanismo de retroalimentación negativo ejercido por los esteroides en la secreción de las gonadotropinas no es funcional, debido a la presencia de la α -fetoproteína (Fig. 25) (Becú y Villalobos, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Se ha reportado que la concentración de la FSH en plasma empieza aumentar a partir de los 12 días de edad y alcanza su mayor concentración alrededor del día 15 (Döhler y Wuttke, 1974, 1975; Ojeda y Urbanski, 1994), este hecho permite explicar el porque al final de la etapa infantil (18 días) un mayor número de folículos inició su desarrollo, lo cual se

reflejó en el aumento en el número de folículos pequeños y alcanza su máximo número al inicio de la etapa juvenil (21 y 24 días) (Fig. 10, 25 y 26).

Villavicencio y Domínguez (1993), mostraron que en los ovarios de animales inmaduros (21 y 24 días de edad) tratados con PMSG se incrementa el diámetro folicular promedio a las 72 horas postratamiento. Por ello, es posible pensar que el mayor número de folículos presentes al inicio de la etapa juvenil, se debe en parte a la acción de la FSH. La importancia de las gonadotropinas para mantener el crecimiento del folículo, también es apoyada por las evidencias que señalan, que al bloquear el incremento en la secreción de la FSH durante la etapa infantil, disminuye el número de folículos medianos y grandes en la fase peripuberal (35 días) (Uilenbroek y col., 1976; Uilenbroek y Wolff-Exalto, 1979). Con base en nuestros resultados y los reportados por otros, es posible sugerir que el aumento en la concentración de las gonadotropinas en hembras inmaduras es necesario para mantener el crecimiento folicular.

En la rata, el desarrollo del folículo tiene una duración de 17 a 19 días (Hage y col., 1978; Domínguez y col., 1991), lo que explica la falta de folículos medianos y preovulatorios ($>500 \mu\text{m}$) en los ovarios de los animales sacrificados durante la mayor parte de la etapa infantil (10 a 18 días) (Fig. 10). Así mismo, en nuestros resultados se observa que la aparición de folículos medianos al final de la etapa infantil (18 días), se acompaña del incremento en la concentración de estrógenos (Fig. 26). Por lo que es posible que esta hormona al actuar de manera conjunta con la FSH, estimule el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. Al momento se sabe que los estrógenos inducen la aparición de los receptores a la FSH en las células de la granulosa, lo que se traduce en un mayor desarrollo del folículo ovárico (Joanne y col., 1976; Ramaley, 1979). Estas evidencias experimentales explican en parte, el incremento en el desarrollo folicular observado al inicio de la etapa juvenil (21 y 24 días).

Los cambios en la concentración de estrógenos no son significativos durante la mayor parte del desarrollo prepuberal (Fig. 15). Sin embargo, se observan tendencias que coinciden con las ondas de desarrollo folicular y el aumento en el índice de atresia. Es decir, se observa

que la concentración de 17β -estradiol tiende a aumentar cuando se da la onda de desarrollo folicular, y tiende a disminuir cuando incrementa el índice de atresia durante la etapa juvenil.

El incremento en la concentración de estrógenos al final de la etapa infantil, posiblemente esta vinculado a la aparición de los folículos antrales, ya que estos son la principal fuente de estrógenos (Gore-Langton y col., 1994). A medida que avanza el desarrollo del folículo, este adquiere la capacidad de producir más estrógenos, esto se debe principalmente a que en las células de la teca de los folículos medianos aumenta la actividad de la 17α -hidroxilasa:C-17,20 liasa, la cual participa en la producción de los andrógenos (Ramaley 1979 y Gore-Langton y col., 1994).

Además de los factores hormonales ya señalados, que participan en el desarrollo del folículo se debe tener presente al péptido similar a la GnRH (GnRH-like), el cual se une a receptores específicos en las células de la granulosa y de la teca (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994). Los receptores a este péptido aparecen al final de la etapa infantil y su número se incrementan durante la fase juvenil (Ojeda y Urbanski, 1994). Al parecer la GnRH-like induce atresia folicular (Joanne, 1994; Hsueh, 1994) y cuando se administra a ratas hipofisectomizadas tratadas con estradiol, se induce la atresia en los folículos preantrales (Joanes 1994). Por lo que estas evidencias nos permiten pensar que el incremento en el índice de atresia observado a partir del día 26 esta vinculado a una mayor acción de la GnRH a nivel del ovario y a la baja concentración de FSH y LH observada durante esta fase.

En lo resultados se observa que el índice de atresia en folículos medianos es muy alto (Fig. 11). Se ha mostrado que en la rata el 70% de los folículos atrésicos son antrales, esto sugiere que la transición de folículo primario a antral es crucial (Greenwald y Roy, 1994). Como ya menciono en párrafos anteriores, la concentración de gonadotropinas después de los 15 días de edad permanece baja, esto puede explicar el alto índice de atresia observado en folículos medianos a partir de los 18 días, ya que se señala que un folículo pequeños antral únicamente continua su crecimiento hasta etapas preovulatorias, si aumenta la concentración

sérica de las gonadotropinas (Joannes, 1994). Además, se ha mostrado que la superovulación en ratas inmaduras inducida por la administración de PMSG, se debe a que esta hormona rescata a los folículos antrales de la atresia de tal manera que un mayor número de folículos, alcanzan la etapa preovulatoria y ovulan (Brawn y Tsafri, 1980).

La baja concentración de la LH al final de la etapa infantil y durante la juvenil esta relacionado con la menor sensibilidad de la hipófisis a la GnRH, así como a la manifestación del mecanismo de retroalimentación negativo que ejercen los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas (Becú y Villalobos 1990; Ojeda y Urbanski 1994).

Nuestros resultados muestran que sólo en los días cercanos a la pubertad la concentración de progesterona es alta y este aumento esta vinculado al incremento en la concentración de estrógenos observado en estos días (Fig. 15 y 27). Esto posiblemente se deba a que el paso limitante en la biosíntesis de los estrógenos es la producción de progesterona y de andrógenos como ha sido reportado previamente (Gore-Langton y col., 1994). Con relación a esto, se señala que durante la tarde del proestro el aumento en la secreción de estrógenos se debe principalmente al incremento de la concentración de andrógenos aromatizables (Gore-Langton y col., 1994). Por lo antes mencionado, es posible que los cambios hormonales observados durante los días cercanos a la pubertad, sean el reflejo de la presencia de los folículos preovulatorios, ya que se señala que este tipo de folículos son la principal fuente de estrógenos, lo cual se debe al incremento en la actividad de la aromatasa (Fig. 27). Otro factor que puede contribuir al aumento en la concentración de progesterona durante los días cercanos a la pubertad, es el hecho de que en algunos folículos preovulatorios el proceso de luteinización comienza antes o después de la secreción preovulatoria de LH (Gore-Langton y col., 1994).

Los resultados obtenidos en este estudio sobre la cuantificación de neurotransmisores en hipotálamo anterior, medio y posterior, muestran que la concentración de NA en el hipotálamo anterior y medio aumenta conforme avanza el desarrollo del animal (Fig. 16 y 17), estas observaciones concuerdan con las obtenidas por Karki y col. (1962), quienes

observan que la concentración del neurotransmisor en cerebro completo aumenta con la edad de la rata, así mismo Macho y col. (1986) y Rivera y col. (1991) señalan que la concentración de la noradrenalina y su metabolito en el hipotálamo completo aumenta a medida que el animal se acerca a la pubertad. Mientras que, difiere de lo obtenido por Weiner y Ganong (1972), quienes observan que la concentración de este neurotransmisor en hipotálamo completo se triplica entre los 10 y 30 días de edad y en las siguientes edades disminuye. Sin embargo, las diferencias entre nuestro estudio y el de Weiner y Ganong, posiblemente se deba a que se evalúan diferentes edades del desarrollo prepuberal.

Durante el desarrollo prepuberal de la rata la concentración de NA en el hipotálamo anterior y medio tiende a aumentar a medida que avanza el desarrollo del animal, sin embargo en algunas edades se observa que la concentración de este neurotransmisor disminuye (Fig. 16 y 17). Este comportamiento posiblemente está vinculado al incremento en la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis del neurotransmisor, ya que se señala que el aumento en la concentración de NA en cerebro conforme el animal se desarrolla, se acompaña del incremento en la actividad de la tirosina hidroxilasa (Hedner y Lundborg, 1981). Así mismo, Coyle y Axelrod (1972b) muestran que la actividad de la dopamina- β -hidroxilasa y la concentración de NA en el cerebro aumentan durante las primeras tres semanas de vida. Estas evidencias experimentales permiten explicar la tendencia al aumento de la concentración de NA en el hipotálamo anterior y medio, pero no explican la disminución de este parámetro en algunas edades, lo cual indica que posiblemente la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de este neurotransmisor en el hipotálamo, presentan fluctuaciones durante el desarrollo prepuberal. Esta idea es apoyada, por lo observado por Krieger y Wuttke (1980), quienes señalan que la actividad de la dopamina- β -hidroxilasa en el área preóptica es alta a los 15 días, mientras que en las siguientes edades es menor, así mismo observan que en hipotálamo medio la actividad de esta enzima aumenta conforme avanza la edad del animal. Estas observaciones corroboran nuestros resultados donde se muestra que la concentración de la NA en el hipotálamo anterior aumenta a la mitad de la etapa infantil y en las siguientes edades disminuye, para incrementarse nuevamente durante la fase peripuberal,

mientras que en hipotálamo medio la concentración de la NA aumenta a medida que avanza el desarrollo del animal.

Se señala que en la etapa infantil la neurona noradrenérgica tienen poca capacidad de almacenar al neurotransmisor y conforme el animal madura la neurona adquiere esta función (Karki y col., 1962). Por lo antes mencionado podemos pensar que a medida que se sintetiza el neurotransmisor, este estaría siendo liberado y metabolizado, lo cual explica el incremento en la concentración de su metabolito y de la actividad de la neurona noradrenérgica observado en esta fase.

Conforme avanza el desarrollo del animal parecería que el sistema noradrenérgico en hipotálamo anterior y medio es menos activo, ya que la relación [MHPG]/[NA] es menor en las etapas juvenil y peripuberal respecto a la infantil (Fig. 16 y 17). Sin embargo, a medida que avanza el desarrollo del animal, la neurona tiene una mayor capacidad de almacenar al neurotransmisor (Karki y col., 1962). Además, la concentración del aminoácido precursor, tirosina, es alta y constante durante los primeros 14 días de vida y después disminuye (Hedner y Lundborg 1981). Estos hechos nos llevan a sugerir que la NA que se sintetiza durante la fase juvenil y peripuberal, se almacena en mayor proporción y por tanto su degradación sería más lenta, lo que se traduce en una menor actividad de este sistema de neurotransmisión con la edad del animal. Lo antes mencionado sugiere que los cambios en la actividad de este sistema son el resultado de la maduración funcional de la neurona noradrenérgica. Además, los cambios en la actividad del sistema noradrenérgico pueden ser un reflejo del establecimiento de la inervación del hipotálamo. Al respecto se señala que la maduración de este sistema de neurotransmisión culmina alrededor de la segunda y tercera semana de desarrollo posnatal y que a los 21 días de edad la inervación catecolaminérgica del hipotálamo se ha desarrollado por completo (Loizou, 1972).

Nuestros resultados sobre la cuantificación de la DA en el hipotálamo anterior y medio difieren de lo reportado por Coyle y Axelrod (1972b), Hedner y Lundborg (1981), Macho y col. (1986); Rivera y col. (1991), quienes mencionan que la concentración de este

neurotrasmisor en el cerebro o en el hipotálamo completo, se incrementa conforme avanza la edad del animal. Estas diferencias posiblemente están vinculadas, al hecho de que en nuestro estudio se analizan los cambios en la concentración de DA en hipotálamo anterior, medio y posterior, y únicamente en la última región se observó el incremento en la concentración de DA con la edad, lo cual nos permite pensar que la tendencia al aumento en la concentración de este neurotrasmisor, observada por otros autores puede presentarse únicamente en algunas áreas del cerebro o del hipotálamo. Esta idea es apoyada por el estudio realizado por Palkovits y col. (1974), quienes observan que existe una distribución heterogénea de la concentración de DA en los diferentes núcleos hipotalámicos. Otras evidencias que apoyan lo anterior son las reportadas por Krieger y Wuttke, 1980 y Hedner y Lundborg, 1981, quienes señalan que la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa en el hipotálamo permanece baja durante el desarrollo prepuberal de la rata, mientras que en el cerebro completo su actividad aumenta a medida que avanza el desarrollo del animal.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que no existe un paralelismo entre la concentración de dopamina y de su metabolito en hipotálamo anterior, medio y posterior (Fig. 19, 20 y 21), esto nos permite pensar que este neurotrasmisor no se metaboliza a medida que se sintetiza. Lo cual posiblemente nos está indicando una baja actividad de la catecol-o-metil transferasa (enzima que metaboliza la dopamina), lo que se refleja en la baja concentración de DOPAC durante la mayor parte del desarrollo del animal. Lo antes mencionado explica la baja actividad de la neurona dopaminérgica observada en el hipotálamo anterior, medio y posterior durante el desarrollo prepuberal de la rata.

La concentración de DA y su actividad en el hipotálamo anterior, medio y posterior sigue patrones muy diferentes, esto posiblemente está asociado a la maduración de este sistema de neurotrasmisión y al establecimiento de la inervación dopaminérgica del hipotálamo. Al respecto, se ha mostrado, que la proliferación de las terminales dopaminérgicas culmina hasta la cuarta semana de desarrollo posnatal y que ocurre a diferentes tiempos en cada una de las estructuras del sistema nervioso central, lo cual apoya la

idea de que existen diferencias en la velocidad de desarrollo de las neuronas dopaminérgicas en las diferentes regiones del hipotálamo (Loizou, 1972).

Nuestros resultados muestran que en el hipotálamo anterior, medio y posterior la concentración de 5-HT tiende a aumentar durante el desarrollo prepuberal de la rata (Fig. 22, 23 y 24), observaciones similares han sido reportadas por otros autores en el cerebro completo (Karki y col., 1962), en el hipotálamo completo (Rivera y col., 1991) y en el área preóptica hipotalámica anterior (Watts y Stanley, 1984). Sin embargo, Macho y col. (1986) señalan que la concentración de la 5-HT es alta a los 12 días de vida, pero en las siguientes edades disminuye. Esta contradicción entre la información reportada y los datos obtenidos en este estudio posiblemente se deban a que la distribución de este neurotransmisor es diferente en cada región del sistema nervioso (Palkovits, 1974).

El aumento con la edad en la concentración de serotonina en las tres regiones del hipotálamo, posiblemente está vinculado a la disponibilidad del aminoácido precursor, el triptófano, al respecto se ha mostrado que durante los primeros días de vida la concentración de la serotonina cambia en relación a la disponibilidad del aminoácido (Zeisel y col., 1981). Otro de los factores a considerar, es la actividad de la enzima triptófano hidroxilasa, que transforma el triptófano en 5-hidroxitriptófano (producto intermedio en la síntesis de serotonina), ya que se señala que la actividad de esta enzima también aumenta con la edad del animal (Deguchi y Barchas, 1972).

Los cambios en la concentración de la serotonina y su metabolito el 5-HIAA durante la fase infantil, nos indica que existe un paralelismo entre la tasa de síntesis, liberación y metabolismo del neurotransmisor. Es posible que conforme se sintetiza la serotonina sea liberada y metabolizada, lo que explica la alta actividad de la neurona serotoninérgica en los animales infantiles, esta idea es apoyada por los resultados de Karki y col. (1962), quienes señalan que la capacidad de la neurona serotoninérgica de almacenar al neurotransmisor es menor en los primeros días de vida del animal, que en los animales adultos.

Durante el desarrollo posnatal de la rata, la actividad del sistema serotoninérgico permanece alta, este evento posiblemente está vinculado a la mayor síntesis y degradación de la serotonina (Fig. 22, 23 y 24). Se ha mostrado, que la actividad de la triptofano hidroxilasa en el cerebro, se incrementa durante el desarrollo prepuberal de la rata (Schmidt y Sanders-Bush, 1971). Este mismo comportamiento se ha reportado para la actividad de la enzima monoamina oxidasa (enzima que cataboliza la serotonina) (Schmidt y Sanders-Bush 1971; Karki y col., 1962). Sin embargo, esta última evidencia no explica el hecho de que durante la etapa juvenil y peripuberal, el incremento en la concentración de serotonina no se acompañe del aumento en la concentración de su metabolito. Con relación a esto, se ha mostrado que la capacidad de almacenamiento del neurotransmisor es mayor en estas etapas (Karki y col., 1962). En conjunto estos resultados permiten plantear que la gran actividad de la enzima triptofano hidroxilasa resulta en la mayor síntesis de la serotonina, pero se libera lentamente y es rápidamente metabolizada lo cual explica la menor concentración de su metabolito y su no paralelismo con la concentración de serotonina observada durante la etapa juvenil y peripuberal.

Las variaciones observadas en la concentración de los neurotransmisores y sus respectivos metabolitos en las tres regiones del hipotálamo estudiadas y las diferencias encontradas respecto a lo reportado por varios autores, posiblemente este vinculado a numerosos factores. En primer lugar, se sabe que la concentración de los neurotransmisores es heterogénea en cada una de las regiones del cerebro y en cada núcleo hipotalámico (Palkovits, 1974). Lo que es posiblemente un reflejo del desarrollo funcional de las neuronas y del establecimiento de la inervación catecolaminérgica y monoaminérgica de las diferentes estructuras del cerebro, ya que se sabe que estos procesos ocurren a diferentes tiempos en cada área del sistema nervioso central (Loizou, 1971). Finalmente, la concentración de cada neurotransmisor depende de la actividad de las enzimas involucradas en su biosíntesis y de la disponibilidad de los aminoácidos precursores, parámetros que presentan fluctuaciones durante el desarrollo prepuberal de la rata y los cuales no son iguales en las diferentes regiones del cerebro y del hipotálamo.

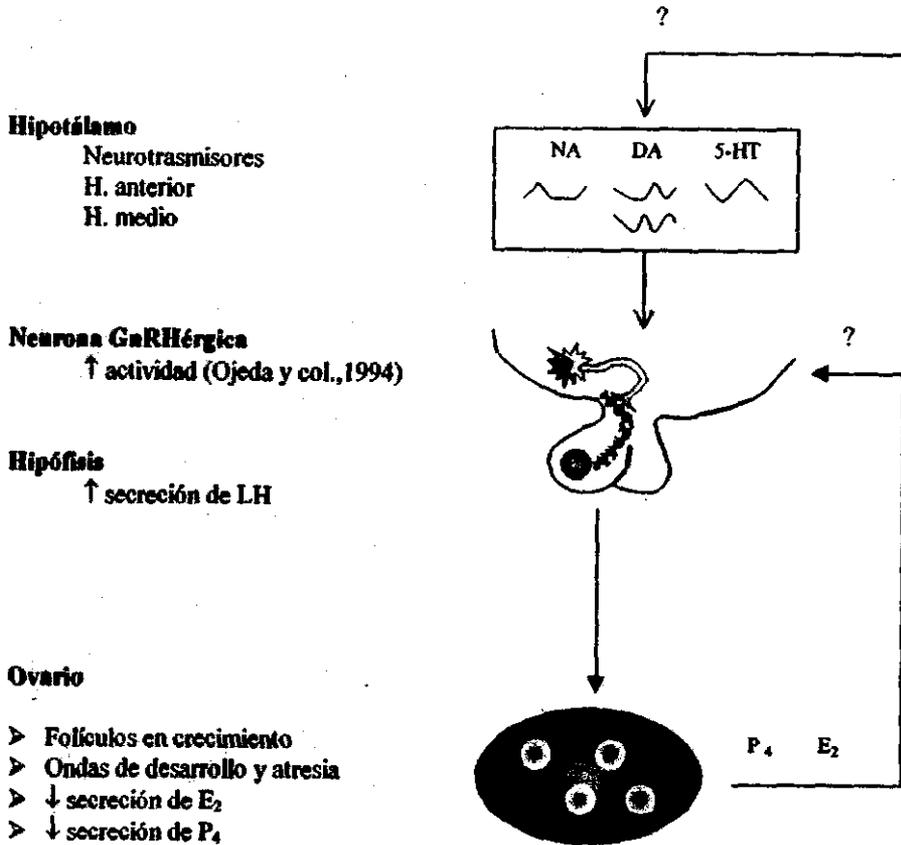
Los cambios en la actividad del sistema noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico observados durante el desarrollo prepuberal de la rata, posiblemente están vinculados con la regulación de la secreción de las gonadotropinas, en particular de la LH, como ha sido señalado previamente (Fink 1988, Becú y Villalobos 1990; Ojeda y Urbanski 1994). Así mismo, se ha mostrado que la influencia de cada sistema de neurotransmisión varía a lo largo del desarrollo prepuberal de la rata, es posible que este evento está relacionado a la maduración de la neurona productora de la GnRH y al establecimiento de los centros tónico (localizado en el hipotálamo medio basal) y cíclico del hipotálamo (localizado en el hipotálamo anterior) los cuales se encargan de regular la secreción de las gonadotropinas (Fink, 1988 y Brown, 1994), así como a la maduración de los mismos sistemas de neurotransmisión (Fig. 25, 26 y 27).

Con relación a lo antes mencionado, Se ha mostrado que durante la etapa infantil se inicia la maduración morfológica de la neurona productora de la GnRH y el hipotálamo anterior y medio recibe poca inervación catecolaminérgica. De manera contraria, durante la etapa juvenil la neurona GnRHérgica a madurado completamente y se establece la inervación catecolaminérgica del hipotálamo anterior y medio (Loizou, 1972; Ojeda y Urbanski 1994).

Es difícil establecer una relación entre la concentración sérica de la LH y la actividad de los sistemas de neurotransmisión en hipotálamo anterior, medio y posterior. Con los resultados de la actividad de la neurona noradrenérgica en el hipotálamo anterior y medio observados en este estudio, es posible sugerir que este sistema de neurotransmisión parece tener un efecto estimulante en la secreción de la LH durante el desarrollo prepuberal de la rata. Estos resultados no concuerdan con lo reportado por Moguilevsky y col. (1990), quienes observan que la noradrenalina participa de manera diferencial a lo largo del desarrollo prepuberal en la rata, entre los 14 y 16 días de edad tiene un efecto inhibitorio en la secreción de las gonadotropinas, mientras que a los 30 días y en la etapa adulta su efecto es estimulante.

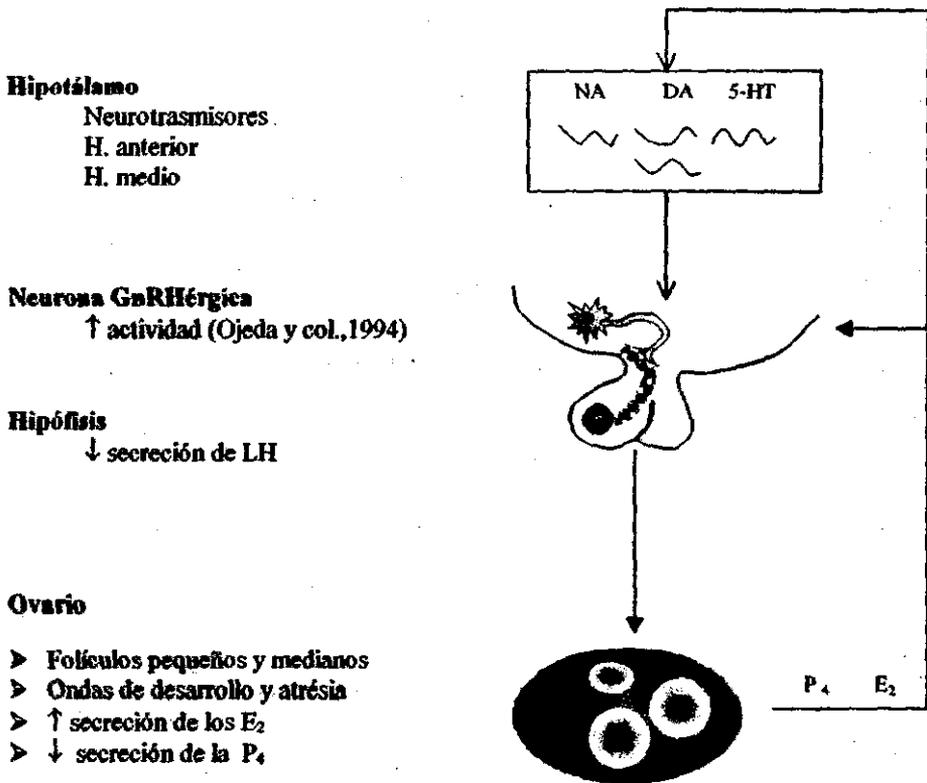
Nuestros resultados sobre la participación del sistema dopaminérgico del hipotálamo en la secreción de la LH, indican que este neurotransmisor participa de manera inhibitoria en la secreción de esta gonadotropina. Esta idea es apoyada por lo observado por Moguevsky y col. (1990) quienes observan que al bloquear la síntesis de catecolaminas a ratas de 14 y 16 días de edad, se incrementa la concentración de la FSH y LH sérica.

En nuestros resultados se observa que la serotonina del hipotálamo anterior y medio estimula la secreción de la LH durante la etapa infantil e inicio de la juvenil (10-26 días de edad), mientras que en las siguientes edades tiene un efecto inhibitorio. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Moguevsky y col. (1985, 1987) quienes observan que la administración de 5-HTP (precursor de la serotonina) estimula la secreción de la LH a los 16 y 20 días de edad, mientras que a los 26 días no parece tener ningún efecto.



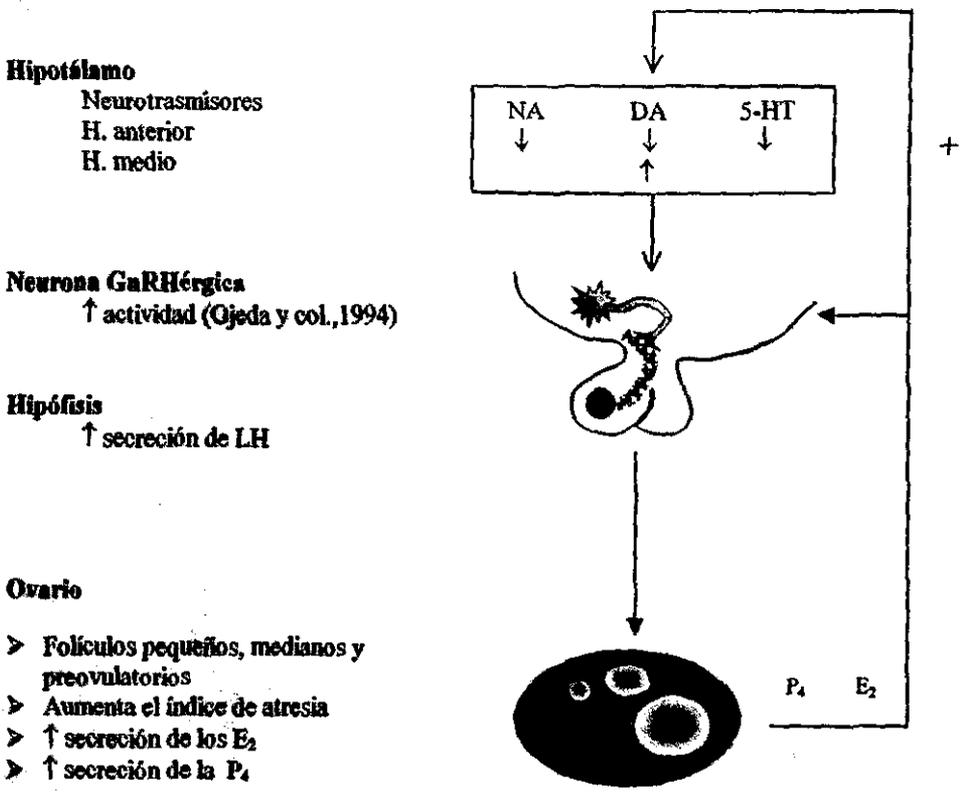
ETAPA INFANTIL

Figura 25. Principales eventos que se suceden en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante la etapa infantil de la rata. Las líneas enmarcadas en el compartimento del hipotálamo representan la actividad de las neuronas noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica en el hipotálamo anterior y medio. Las flechas en el compartimento del ovario indican que la secreción de las hormonas ováricas aumenta (↑) o disminuye (↓). El símbolo (?) indica que el efecto de la retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos no es funcional. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), hormona luteinizante (LH), progesterona (P₄) y 17-β estradiol (E₂).



ETAPA JUVENIL

Figura 26. Eventos que se suceden en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante la etapa juvenil de la rata. Las líneas enmarcadas en el compartimento del hipotálamo representan la actividad de las neuronas noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica en el hipotálamo anterior y medio. Las flechas en el compartimento del ovario indican que la secreción de las hormonas ováricas aumenta (↑) o disminuye (↓). El símbolo (-) indica que el efecto de retroalimentación negativa que ejercen los estrógenos ya es funcional durante esta etapa. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), hormona luteinizante (LH), progesterona (P₄) y 17-β estradiol (E₂).



ETAPA PERIPUBERAL

Figura 27. Eventos que se suceden en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, durante el desarrollo peripuberal de la rata hembra. Las flechas (↑ o ↓) enmarcadas en el compartimento del hipotálamo indican la actividad de las neuronas noradrenérgica, dopaminérgica y serotoninérgica en el hipotálamo anterior y medio. Las flechas en el compartimento del ovario indican que la secreción de las hormonas ováricas aumenta (↑) o disminuye (↓). El símbolo (+) indica que el efecto de retroalimentación positiva que ejercen los estrógenos se manifiesta durante esta etapa. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), hormona luteinizante (LH), progesterona (P₄) y 17-β estradiol (E₂).

CONCLUSIONES

- ◆ Durante el desarrollo prepuberal de la rata se presentan ondas de desarrollo y atresia folicular, las cuales están vinculadas a la secreción de los estrógenos y la LH.

- ◆ La concentración de estrógenos aumenta a medida que avanza la edad del animal, y esto está relacionado con el desarrollo y la maduración funcional del folículo ovárico.

- ◆ La actividad del sistema noradrenérgico, dopaminérgico y serotoninérgico varía a lo largo del desarrollo de la rata, este evento posiblemente está vinculado a la maduración de los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y como consecuencia el inicio de la pubertad.

BIBLIOGRAFÍA

- Advis J.P., Simpkins J.W., Chen H.T., Meites J.** (1978). Relation of biogenic amines to onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*, 103:11-16.
- Araki S., Toran C.D., Ferin M., Vande R.L.** (1975). Immunoreactive gonadotropin-releasing hormone (GnRH) during maturation in the rat: Ontogeny of regional Hypothalamic differences. *Endocrinology*, 97: 693-697.
- Becú-Villalobos D., Lacau-Mengido, T.M.** (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Act. Physiology Pharmacology Latinoamerica*, 40:1-17.
- Bousfield R.G., Ferry M.W., Ward D.N.** (1994). Gonadotropins, chemistry and biosynthesis. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y J.D. Neill (Eds.). 2a ed. Raven Press, New York, p.p. 1749-1792
- Bowers C.Y., Sartor A.O., Reynolds G.A., Badger M.T.** (1991). On the actions of the growth hormone-releasing hexapeptide, GHRP. *Endocrinology*, 128: 2027-2035.
- Brailowsky S.** (1995). *Las sustancias de los sueños*. Fondo de cultura Económica. México, p.p.15-95.
- Brawn H.R., Tsafiri A.** (1980). Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *Journal Reprod. Fert.*, 59: 267-272.
- Brenner R. M., Slayden O. D.** (1994). Cyclic changes in the primate oviduct and endometrium. En: *Physiology of Reproduction* E. Knobil y J.D. Neill (Eds.). 2a ed. Raven Press, New York, p.p. 541-569.
- Brown E.R.** (1994). *An introduction to Neuroendocrinology*. Cambridge University Press, p.p. 40-87.
- Byskov G..A.** (1978). Follicular atresia En: *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. R.E. Jones (Eds.). Plenum Press, New York and London, 533-559.
- Carr A.L., Voogt L.J.** (1980). Catecholamines synthesizing enzymes in the hypothalamus during the estrous cycle. *Brain Research*, 196: 437-445.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

- Coyle J.T., Axelrod J. (1972a).** Dopamine- β -hydroxylase in the rat brain: Developmental Characteristics. *Journal of Neurochemistry*, 19: 449-459.
- Coyle J.T., Axelrod J. (1972b).** Tyrosine hydroxylase in the rat brain: Developmental Characteristics. *Journal of Neurochemistry*, 19:1117-1123.
- Deguchi T. y Barchas J. (1972).** Regional distribution and developmental changes of triptophan hydroxylase activity in the rat brain. *J. Neurochemical*. 19:927-929
- Döhler K. D., Wuttke W. (1974).** Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, 94: 1003-1008.
- Döhler K.D., Wuttke W. (1975).** Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*, 97: 890-907.
- Domínguez R., Chávez R., Cruz M.E. (1991).** La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. R. Domínguez (Ed.). UNAM-PURRUA, México, p.p 102-161.
- Feder H.H. (1981).** Estrous cyclicity in mammals. En: *Neuroendocrinology of Reproduction Physiology and Behavior*. N.T. Adler (Ed.). Plenum press, New York, p.p.285-310.
- Fink G. (1986).** The endocrine control of ovulation. *Sci. Prog Oxf*. 70:403-423.
- Fink G. (1988).** Gonadotrophin secretion and its control. En: *Physiology of Reproduction* E. Knobil y J.D. Neill (Eds.). 2a ed. Raven Press, New York, p.p. 1349-1378.
- Finn C.A., Booth J.E. (1977).** The physiological effects of estrogens and progesterona. En: *The Ovary: Regulation of Oogenesis and Steroidogenesis*. L. Zuckerman y B.J. Weir (Eds.). Academic Press. New York. Vol. III. p.p. 151-226.
- Fortune J.E. (1994).** Ovarian follicular growth and development in mammals. *biology of reproduction*, 50: 225-232.

- Edgar A., Henster J.G.** (1993). Serotonin. En: **Basic Neurochemistry**. J.G. Siegel, W.B. Agranoff, W.R. Albers, B.P. Molinoff (Eds). Raven Press. New York, p.p. 282-308.
- Fryer L.S.** (1980). Neurochemical system of the hypothalamus. En: **Handbook of the Hypothalamus: Behavioral Studies of the hypothalamus**. P.J. Morgant y J. Panksepp (Eds.). Marcel Dekker, INC. New York, Vol 3- part A. p.p. 299-438.
- Genuth M.S.** (1993) Sistema endoócrino. En: **Fisiología**. R. Berne y M. Levy (Eds). Mosby Year Book. España, p.p. 478-617.
- Goodman G.A., Rall W.T., Nies S.A., Taylor P.** (1995). Las bases farmacológicas de la terapéutica. 3a rp. México. 1751p.
- Gore-Langton R.E., Armstrong D.T.** (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil y J.D. Neill (Eds.). 2a ed. Raven Press, New York, p.p. 571-611.
- Greenwald G.S., Roy S.K.** (1994). Follicular development and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil y J.D. Neill (Eds.). 2a ed. Raven Press, New York, p.p. 629-721.
- Hadfield M.G., Crane M.E., Nuget E.A., Milio C. y Narashimaschari N.** (1985). Determination of 13 catecholamines, indolamines, metabolites and precursors in less than 20 minutes during a simple HPLC run. *J. Liq. Chrom.* 8:89-2697.
- Hage A.J., Groen-Klevant, Welschen R.** (1978). Follicle growth in the immature ovary. *Acta Endocrinologica*. 88: 375-382.
- Ham W.A.** (1985). "Tratado de Histología". 8a ed. Interamericana, México, p.1059.
- Hedner T., Lundborg P.** (1981). Neurochemical characteristics of cerebral catecholamine neurons during the postnatal development in the rat. *Review Article Medical Biology* 59; 212-223

- Hillier G.S.** (1994). Hormonal control of folliculogenesis and luteinization. En: **Molecular Biology of the Female Reproductive System**. J. K. Findlay (Ed.). Academic Press; p.p. 1-25.
- Hirshfield A.N., Migdley A.R.** (1978). Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 19: 597-605.
- Hirshfield A.N.** (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *Internal Rev. Cytol.*, 124: 43-101.
- Hoffman G.E., Phelps C. J., Khachaturian H., Sladek J.R.** (1986). Neuroendocrine projections to the median eminence. En **Morphology of Hypothalamus and its Connections**. D. Ganten y D. Pfaff (Eds.). New York., p.p. 161-196.
- Höhn K.G., Wuttke W.** (1979). Ontogeny of catecholamine turnover rates in limbic and hypothalamic structures in relation to serum prolactin and gonadotropin levels. *Brain Research.*, 179: 281-293.
- Hsueh A.J., Billing H., Tsafriri A.** (1994). Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev.*, 15: 707-723.
- Jean-Louis Ch., Ponce G., Joseph-Bravo P.** (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En: **Temas Selectos de Biología de la Reproducción**. R. Domínguez (Ed.). UNAM-PURRUA, México, p.p. 57-72.
- Jennes L., Beckman W.C., Stumpf W.E., Grzanna R.** (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. *Exp Brain Res*, 46: 331-338.
- Jennes L., Stumpf W. E., Tappaz M. L.** (1983). Anatomical relationships of dopaminergic and gabaergic systems with the GnRH-system in the septo-hypothalamic Area. *Exp Brain Res*. 50:91-99.
- Joanne S.R., Ireland J.L., Rao M.C., Bernath G.A., Midgley A.R., Reichert J.R.** (1976) Ovary follicular development in the rat: hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone, *Endocrinology*, 99:1562-1570

- Joanne S.R.** (1994). Hormonal control of gene expression in the ovary. *Endocrine Reviews*, 15: 725-743.
- Karki N., Kuntzman R., Brodie B.B.** (1962). Storage, synthesis, and metabolism of monoamines in the developing brain. *Journal of Neurochemistry*, 9: 53-58.
- Kerdelhué B., Bojda Florence., Lesieur P., Pasqualini C. El Abed A., Lenoir V., Douiller P. Chiueh M. C., Palkovits M.** (1989). Media eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology*, 49: 176-180.
- Kiss J., Halász** (1985). Demonstration of serotonergic axons terminating on luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. *Neuroscience*, 14:69-78.
- Kordon C., Druva V.S., Martínez E.G., Weiner R.Y.** (1994). Role of Classic and Peptide Neuromediators in the Neuroendocrine Regulation of Luteinizing Hormone Prolactin. En: **The Physiology of Reproduction**. E. Knobil y J.D. Neill (Eds). 2a ed. Raven Press, New York, p.p. 1621-1683.
- Krieger y Wuttke.** (1980). Ontogeny of tyrosine hydroxylase and dopamine- β -hydroxylase activity in discrete limbic and hypothalamic structures of female rats. *Brain Research*, 193: 181-188.
- Lesson, S.T.** (1985). "Histología". ed. Interamericana, México, p. 587.
- Loizou L.A.** (1972). The postnatal ontogeny of monoamine-containing neurones in the central nervous system of the albino rat. *Brain Research*, 40: 395-418.
- Louis C.J., Ponce G., Bravo J.P.** (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. R. Domínguez. (Ed.). UNAM-PURRUA, México, p.p. 57-82.
- Macho L., Kvetnansky R., Culman J., Fickova M.** (1986). Neurotransmitter levels in the hypothalamus during postnatal development of rats. *Exp. Clin. Endocrinol*, 88: 142-150.

- Meyerson B.J., Sawyer C.H. (1968).** Monoamines and ovulation in the rat. *Endocrinology* 83: 170-176.
- Moguilevsky J.A., Faigón M.R., Scacchia P., Szwarcfarb B. (1985).** Effect of the serotonergic system on Luteinizing Hormone Secretion in Prepuberal Female Rats. *Neuroendocrinology*, 40: 135-138.
- Moguilevsky J.A., Faigón M.R., Scacchia P., Szwarcfarb B. (1987).** Role of sexual differentiation of the hypothalamus in the differential effect of serotonergic system on LH in prepubertal male and female rats. *Neuroendocrinology*, 45:274-277.
- Moguilevsky J.A., Arias P., Szwarcfarb B., Carbone S., Rondina D. (1990).** Sexual maturation modifies the catecholaminergic control of gonadotrophin secretion and the effect of ovarian hormones on hypothalamic neurotransmitters in female rats. *Neuroendocrinology*, 52:393-398.
- Müller E.E., Nistico G. (1989).** *Brain Messengers and the Pituitary.* Academic Press, Inc. p.p. 15-228.
- Nakai Y., Shioda S., Ochiai H., Kozasa K. (1986).** Catecholamine-peptide interactions in the hypothalamus. En: *Morphology of Hypothalamus and its Connections.* D. Ganten y D. Pfaff (Eds.). New York, p.p. 135-160.
- Ojeda S.R., Jameson H.E. (1977).** Developmental patterns of plasma and pituitary growth hormone (GH) in the female rat. *Endocrinology*, 100: 881-889.
- Ojeda S.R., Ramirez V.D. (1972).** Plasma level of FSH and LH in maturing rats: response to hemigonadectomy. *Endocrinology*, 90:466-472.
- Ojeda S.R., Urbanski H.F. (1994).** Puberty in the rat En: *The Physiology of Reproduction.* E. Knobil y J.D. Neill (Eds), Raven Press. New York, p.p.363 - 409.
- Palkovits M., Brownstein M., Saavedra M.J., Axelrod J. (1974).** Norepinephrine and dopamine content of hypothalamic nuclei of the rat. *Brain Research*, 77: 137-149.
- Parent A. (1979).** Anatomical organization of monoamine-and acetylcholinesterase containing neuronal system in the vertebrate hypothalamus. En: *Anatomy of the*

- Hypothalamus.** J. P. Morgane y J. Panksepp (Eds.). Marcel Dekker. New York, p.p. 511-548.
- Paxinos G., Watson Ch.** (1982). *The Rat Brain . in stereotaxic coordinates.* ed. Academic Press.
- Ramaley J.A.** (1979). Development of gonadotropin regulation in the prepuberal mammal. *Biology of Reproduction* 20: 1-31.
- Rivera S., Sanfeliu C., Suñol C., Rodríguez F.E.** (1991). Regional effects on the cerebral concentration of noradrenaline, serotonin and dopamine in suckling rats after single dose of lindane. *Toxicology*, 69: 43-54.
- Ross M.H., Reith E.J., Romrell L.J.** (1992). *Histología texto y Atlas color.* ed. Medica Panamericana. 2^a. edic. México. P. 749.
- Ryan R.J.** (1981). Follicular atresia: some speculations of biochemical markers and mechanisms. En: *Dynamics of Ovarian Function.* N. B. Schwartz y M. Hunzickers-Dunn (Eds). Raven Press, New York, . p.p.1-11.
- Salve M.L., Amich,S., Prieto S., Casas A.** (1994). *Laboratorio clínico, bioquímica.* 1^ª ed. ed. Mc Graw-Hill, p. 496.
- Santiago M., Machado A., Suárez R.F., Cano J.** (1988). Changes in biogenic amines in rat hippocampus during development and aging. *Life Sciences*, 42: 2503-2508.
- Schmidt M.J., Sanders-Bush E.** (1971). Tryptophan hydroxylase activity in developing rat brain. *Journal of neurochemistry*, 18:2549-2551.
- Shannon N.J., Gunnet J.W., Moore K.E.** (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *Journal of neurochemistry*, 47: 958-965.
- Simerly R.B., Swanson W.L., Gorski A. R.** (1985). The distribution of monoaminergic cells and fibers in a periventricular preoptic nucleus involved in the control of

- gonadotropin release: Immunohistochemical Evidence for a Dopaminergic Sexual Dimorphism. *Brain Research*, 330: 55-64.
- Simerly B.R. (1995). Anatomical substrates of hypothalamic integration. En: *The Rat Nervous System*. 2a edc. Paxinos, G. (Eds). Academic Press, new York, p.p. 353-372.
- Skinner K.M., Parrott J.A. (1994). Growth factor-mediated cell-cell interactions in the ovary. En: *Molecular Biology of the Female reproductive System*. J. K. Findlay (Edts). Academic Press. new York, p.p. 67-75.
- Tovar B.N., Aguirre U., Landeros V.J., Palacios P.G. (1984). Análisis de datos y control de calidad en el radioinmunoanálisis. Guía para la evaluación de resultados. *Rev. Invst. Clin.* 36: 179-192.
- Uilenbroek J.T.H.J., Wolff-Exalto A., Blankenstein (1976). Serum gonadotrophins and follicular development in immature rats after early androgen administration. *Journal Endocrinology*, 68:461-468.
- Uilenbroek J.T.H.J., Wolff-Exalto A. (1979). Prepuberal follicular development and ovarian activity in adulthood after suppression of gonadotropin levels in immature female rats. *Biology of Reproduction*, 20: 384-389.
- Ulloa-Aguirre A. (1991). aspectos bioquímicos-funcionales de la hormona estimulante del folículo. En: *Temas Selectos de Biología de la Reproducción*. R. Domínguez. (Ed.). UNAM-PURRUA, México, p.p. 83-92.
- Van Campelle W.A., Meijis-Moelofs H.M.A., Kramer P., Van Den Dungen H.M. (1989). Ovarian Follicle dynamics in immature female rats treated with a luteinizing hormone-releasing hormone antagonist. *Biology of Reproduction*, 40: 1247-1250.
- Villavicencio J., Domínguez R. (1993). Differences in follicular growth and atresia induced by gonadotrophin stimulation in pre-pubertal rats are age-dependent. *Med. Sci. Res.* 21: 361-362.

- Vitale L.L., Villar J.M., Chiocchio R.S.; Tramezzani J.H. (1984).** Median eminence serotonin involved in the proestrus gonadotropin release. *Neuroendocrinology*, 39: 136-141.
- Watts G.A., Stanley F.H. (1984).** Indoleamines in the hypothalamus and area of the midbrain in raphe nuclei of male and female rats throughout postnatal development. *Neuroendocrinology*, 38:461-466.
- Weiner R.I., Ganong W.F. (1972).** Norepinephrine concentration in the hypothalamus, amygdala, hippocampus and cerebral cortex during postnatal development and vaginal opening, *neuroendocrinology*, 9: 65-71.
- Weiner N., Molinoff P.B. (1993).** Catecholamines. En: **Basic Neurochemistry**. J.G. Siegel, W.B. Agranoff, W.R. Albers, B.P. Molinoff (Eds). Raven Press. New York, p.p.261-282
- Wray S., Hoffman G. (1986).** Catecholamine innervation of LH-RH neurons: a developmental study. *Brain Research*, 399: 327-331.
- Zeisel S.T., Mauron Ch. Watkins C.J. y Wurtman R.J. (1981).** Developmental changes in brain indoles serum thryptophan and other serum neutral amino acids in the rat. *Dev. Brain Res* 1:551-564.

APÉNDICE A.***Disección de hipotálamo anterior, medio y posterior***

Para la disección del hipotálamo anterior se consideraron los límites descritos por Paxinos y Watson (1982), rostralmente se delimitó por el quiasma óptico y la comisura anterior, lateralmente por los surcos hipotalámicos laterales y caudalmente por el tracto mamilotalámico. El hipotálamo medio se delimitó rostralmente por el tracto mamilotalámico, lateralmente por los surcos hipotalámicos y caudalmente por los cuerpos mamilares. El hipotálamo posterior se delimitó rostralmente por los cuerpos mamilares, lateralmente por los surcos hipotalámicos y caudalmente por el área tegmental ventral. La profundidad del corte en la disección de cada una de las regiones del hipotálamo fue de 3 mm aproximadamente (Fig. 28).

APÉNDICE B.***Sistema de cromatografía de líquidos***

El sistema de cromatografía consistió de una bomba isocrática (Modelo L-250 Perkin Elmer), una válvula de inyección (Reodine modelo 7125) con una capacidad de 20 µl, una precolumna de sílica (3.5 cm x 4.6 mm) y una columna C-18 de fase reversa (25 cm x 4.6 mm), acoplada a un detector electroquímico amperométrico LC-4C (Bionaltical System Inc.). Los datos fueron procesados por un integrador Nelson 1020 (Perkin-Elmer). La fase móvil consistió de un buffer de citratos (0.1 M) (pH=3.0) con 100 mg de octanosulfonato monohidratado. La solución se filtró en papel millipor (poro de 0.45 µm) y se degaseó a vacío e inmediatamente se le adicionaron 20 ml de acetonitrilo (Merck-México, S. A.) y 15 ml de tetrahidrofurano (Merck-México, S. A.) y el volumen final fue de 500 ml. La fase se bombeó por el sistema a un flujo de 1.2 ml/minuto.

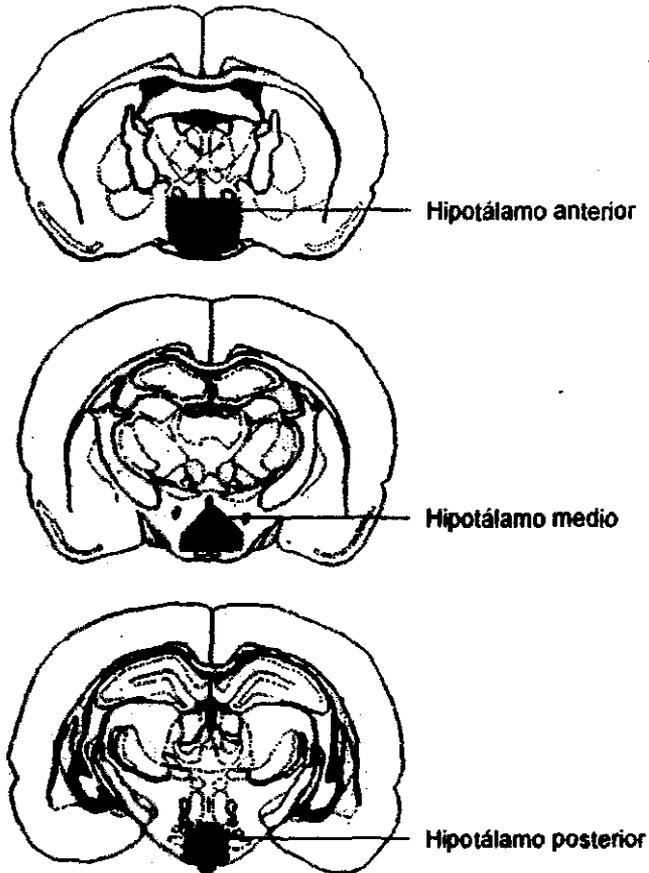


Figura 28. Esquema que muestra la localización del hipotálamo anterior, medio y posterior (Tomado del Atlas de Paxinos y Watson, 1992).

Preparación de soluciones estándar y curva de calibración

En el día del experimento se prepararon soluciones de referencia de noradrenalina (NA) [(-)-Arterenol fase libre], 4-hidroxi-3-metoxifenil glicol (MHPG), dopamina (DA), [3-hidroxy tiramine hydrochloride], 3-4-dihydroxyphenylacetic-acid (DOPAC), serotonina (5-HT) [5-hydroxytryptamina] y 5-hydroxyindole-3-acetic ácido (5-HIAA) en ácido perclórico al 0.1 M y se preparó una curva de calibración con las siguientes concentraciones 0.1, 0.5 y 1.0 ng (ver apéndice A). Únicamente se aceptaron factores de calibración para cada uno de los estándares mayores de 0.95. Todos los fármacos se obtuvieron de Sigma Chemical St. Louis M. USA. La sensibilidad del ensayo para todos los neurotransmisores y sus metabolitos estuvo por encima de 0.01 ng.

El integrador Nelson 1020, calcula la concentración de la muestra problema, al comparar el área bajo la curva de esta, con el área bajo la curva de la solución de referencia de cada uno de los neurotransmisores y sus metabolitos. La concentración se expresó en ng/mg de tejido.

Solución Stock: se preparó una solución de 1 mg/2 ml de ácido perclórico para cada uno de los neurotransmisores, y se almacenaron a -70°C .

Solución A: Se adicionan 50 μl de cada uno de los neurotransmisores y los metabolitos a un matraz ambar y se aforan en 10 ml con ácido perclórico.

Solución B (Estándar de 2.0 ng): Se tomaron 50 μl de la solución A y se adicionan a un tubo endorph que contiene 1200 μl de ácido perclórico.

Solución C (Estándar de 1.0 ng): se tomaron 500 μl de la solución B se diluyeron en 500 μl de ácido perclórico.

Solución D (Estándar de 0.5 ng): se tomaron 500 μl de la solución C y se le agregaron 500 μl de ácido perclórico.

Solución E (estándar de 0.1 ng): se tomaron 100 µl de la solución C y se le adicionaron a 900 µl de ácido perclórico

APÉNDICE C.

Preparación de la curva patrón para radioinmunoanálisis de la hormona luteinizante.

La curva patrón se realiza por duplicado y se utilizaron estándares de 0.05, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 y 6.0 ng.

Tubos Bo: contienen anticuerpo + 1000 µl de hormona marcada (unión máxima)

CT: contienen 1000 µl de hormona marcada (cuentas totales)

Preparación de la curva patrón para radioinmunoanálisis de 17β-estradiol y progesterona

17β-estradiol

- La curva patrón se hace por duplicado, se utilizaron calibradores de 0, 20, 50, 150, 500 pg/ml y se realizaron diluciones para obtener estándares de 0, 10, 20, 50, 75, 150 y 500 pg/ml
- **Bo:** contienen anticuerpo + 1000 µl de hormona marcada (unión máxima)
- **CT:** contienen 1000 µl de hormona marcada (cuentas totales)

Progesterona

- La curva patrón se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores de 0, 0.1, 0.5, 2.0, 10, 20 y 40 ng/ml y se realizaron diluciones para obtener estándares de: 0.02, 0.1, 0.5, 2.0, 10.0, 20.0 y 40.0 ng/ml
- **Bo:** contienen anticuerpo + 1000 µl de hormona marcada (unión máxima)
- **CT:** contienen 1000 µl de hormona marcada (cuentas totales)