

51 262

1
2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
* ZARAGOZA *

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARTICIPACION DE LA INERVACION SEROTONINERGICA
DEL HIPOTALAMO QUE SE ORIGINA EN EL NUCLEO
DORSAL Y MEDIAL DEL RAPE EN LA PRIMERA OVULACION.

LA RATA COMO MODELO DE ESTUDIO



T E S I S

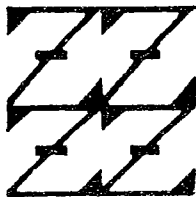
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA
(SISTEMAS HUMANOS)

P R E S E N T A

JUANA MONROY MORENO

U N A M
F E S
Z A R A G O Z A



LO HUMANO EJE
DE NUESTRA REFLEXION

DIRECTORA DE TESIS: DRA: MARIA ELENA AYALA ESCOBAR

MEXICO, D. F.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

1999



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.

PAGINACION

DISCONTINUA

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
* ZARAGOZA ***

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE PROGRADO

**PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN SEROTONINÉRGICA DEL HIPOTÁLAMO
QUE SE ORIGINA EN EL NÚCLEO DORSAL Y MEDIAL DEL RAFÉ EN LA
PRIMERA OVULACIÓN. LA RATA COMO MODELO DE ESTUDIO**

Autor: Juana Monroy Moreno.

Directora: Dra. María Elena Ayala Escobar.

La tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Pubertad de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Durante la realización de esta tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA proyecto IN-208796, del Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS) UNAM y de CONACyT.

A mis padres

María y Raymundo por su gran amor y ejemplo.

A mis hermanos

Silvia, Raymundo, Teresa, Carmen, Laura, Patricia, Jesús, José Luis, Elisa, Irma y Emma L por su constante estímulo.

A los niños

Carlos, Oscar, Alejandro, José Luis, Jenifer, María del Carmen, Diana y Michel por seguirme regalando una sonrisa y recuerden que los amo.

A mis amigos

Esperanza y Jesús por que a pesar de la distancia seguimos siendo amigos.

Lorena y Carolina por que juntas concebimos sueños.

Cesar por que a pesar de los momentos de enojo seguimos siendo amigos.

Marta por su amistad y por sus palabras de aliento.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. María Elena Ayala Escobar por su valiosa amistad y la confianza que a depositado en mí.

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

A los miembros del jurado:

Dra. María Elena Ayala Escobar
Dr. Roberto Domínguez Casalá
Dr. Benjamín Floran Garduño
Dr. Marco Antonio Sánchez Ramos
Dra. María Esther Cruz Beltran

Por sus valiosas aportaciones durante la realización y la revisión de este trabajo.

Al Laboratorio de Hormona Esteroide del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" y al Biol. Roberto Chavira por su colaboración en la realización de la técnica de radioinmunoanálisis.

A María Luisa Illescas Vera por su colaboración técnica en el estudio histológico.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por que cada uno de ustedes hacen posible que en este laboratorio exista una ambiente de amistad.

Al personal técnico del Bioterio de la FES Zaragoza, por el cuidado brindado a los animales utilizados en este estudio.

ÍNDICE

RESUMEN	I
INTRODUCCIÓN	1
Organización del hipotálamo y del sistema productor de la hormona liberadora de las gonadotropinas.....	8
Regulación de la secreción de la GnRH.....	16
Organización del sistema serotoninérgico.....	18
Participación de los núcleos dorsal y medial del raqué en la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.....	26
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
HIPÓTESIS	33
OBJETIVO GENERAL	34
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	34
MATERIALES Y MÉTODO	35
RESULTADOS	41
1.- Caracterización del desarrollo peripuberal de la rata.....	41
2.- Estudiar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del raqué, sobre las edades de la apertura vaginal y del primer estro y la primera ovulación en la rata prepúber.....	47
3.- Analizar los efectos de la lesión del núcleo dorsal del raqué, sobre el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico.....	61
4.- Analizar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del raqué, sobre las concentraciones de la hormona luteinizante, la progesterona y del 17 β -estradiol en el suero.....	64
5.- Analizar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del raqué, sobre la actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo anterior, medio y posterior.....	68

DISCUSIÓN.....	82
CONCLUSIONES.....	99
PERSPECTIVAS.....	100
BIBLIOGRAFÍA.....	101
APÉNDICE.....	113
CONGRESOS.....	119

RESUMEN

La fuente principal de serotonina del hipotálamo que se origina en los núcleos dorsal y medial del rafe, participa en la regulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas. Sin embargo, la información que apoya su participación en tales procesos es contradictoria, ya que algunos autores mencionan que la inervación que se origina en el núcleo dorsal es estimulante, mientras que la que proviene del núcleo medial podría no participar o ejercer un efecto inhibitorio en dichos mecanismos. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la lesión selectiva de los núcleos dorsal o medial del rafe inducida por la microinyección de 10 μ g/2.5 μ l de 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT) en la etapa juvenil (30 días de edad) sobre la pubertad, el crecimiento y maduración del folículo ovárico, la primera ovulación, la concentración sérica de hormonas ováricas (progesterona y 17 β -estradiol) y de la LH y los cambios en la actividad del sistema serotoninérgico en el hipotálamo anterior (HA), medio (HM) y el posterior (HP) y en el núcleo dorsal (ND) o medial (NM) del rafe.

En comparación con el grupo de animales con operación simulada, la lesión parcial (región lateral o central) o completa del núcleo dorsal o medial del rafe no modificó las edades de la apertura y del primer estro vaginal. En los animales en los que la inyección de la 5,6-DHT dañó la región lateral del núcleo, se observó la tendencia al incremento en el número de ovocitos liberados sin llegar a ser diferente estadísticamente (10.4 ± 0.4 vs. 8.9 ± 0.7 , NS). En cambio, cuando se lesionó la región central del núcleo se observó el efecto inverso (6.4 ± 0.6 vs. 8.9 ± 0.7 , $p < 0.05$) y en el grupo en los que se lesionó el núcleo completo, ninguno de los animales ovuló en el día del primer estro vaginal (0/11 vs. 16/18). El bloqueo de la ovulación se acompañó de la disminución en el número de folículos pequeños y medianos (Pequeños: 50.0 ± 13.7 vs. 94.0 ± 14.2 ; Medianos: 1.5 ± 0.3 vs. 4.8 ± 1.7 , $p < 0.05$) y del incremento en la incidencia de atresia en los folículos preovulatorios.

En el día del primer estro vaginal la concentración de progesterona sérica de los animales con lesión completa disminuyó significativamente (Lesión central: 3.2 ± 05 ; Lesión completa:

2.1 ± 0.4 vs. Ácido ascórbico: 7.1 ± 0.9, p<0.05 respectivamente) y no se modificó la concentración de estradiol y de LH. La relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo medio de los animales que no ovularon se incrementó significativamente (0.7 ± 0.06 vs. 0.3 ± 0.05, p<0.05) y en el hipotálamo anterior y posterior no se modificó (HA: 0.8 ± 0.07 VS. 0.5 ± 0.08, NS) (HP: 0.48 ± 1.05 vs. 0.37 ± 0.06, NS). En el núcleo medial del raquí de estos animales se observó la tendencia al incremento de la relación metabolito de serotonina/serotonina (0.8 ± 0.1 vs. 0.6 ± 0.04, NS).

En comparación con el grupo con operación simulada en los animales con lesión fuera, parcial o completa del núcleo medial del raquí no se modificaron la proporción de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados. En los animales con lesión completa, la concentración de 17β-estradiol fue mayor (22.3 ± 1.8 vs. 10.8 ± 1.5, p<0.05) y la de progesterona y LH no se modificó.

La concentración de serotonina aumentó en el HA de los animales con lesión parcial del núcleo medial del raquí (3.9 ± 0.5 vs. 1.7 ± 0.2, p<0.05), mientras que en el grupo con lesión completa la concentración del 5-HIAA en el hipotálamo medio fue menor en relación a los animales que se les inyectó ácido ascórbico (HM: 0.5 ± 0.1 vs. 0.9 ± 0.08, p<0.05) y en el hipotálamo posterior no se modificó (0.7 ± 0.1 vs. 1.02 ± 0.07, NS). La relación [5-HIAA]/[5-HT] en las tres regiones del hipotálamo no se modificó por la lesión química del núcleo medial del raquí.

Los resultados de este estudio permiten sugerir que el sistema serotoninérgico del hipotálamo anterior y medio que se origina en el núcleo dorsal del raquí participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación, mientras que la información serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del raquí parece no participar o ejerce un efecto inhibitorio en tales mecanismos.

INTRODUCCIÓN

El proceso de reproducción es un mecanismo de sobrevivencia, en el que cada especie requiere que sus miembros produzcan nuevos individuos con la finalidad de transmitir la información genética de una generación a la siguiente. A nivel molecular, la reproducción depende de la capacidad de duplicarse de los ácidos nucleicos. Muchos invertebrados se reproducen asexualmente y los descendientes son idénticos a sus progenitores con poca variabilidad genética. En cambio, la mayoría de los vertebrados se reproducen sexualmente, lo que implica la producción por parte de la hembra del óvulo portador de su información genética y su fecundación por el espermatozoide con el complemento de genes procedentes del macho. Este tipo de reproducción tiene la ventaja de promover la variabilidad genética entre los miembros de la especie, debido a que sus descendientes son el producto de una combinación específica de genes aportados por ambos padres, y no una copia genética de un solo individuo. Por ello, los descendientes suelen ser más aptos para sobrevivir a la presión de selección de un ambiente cambiante (Cruz y col., 1998).

En algunos animales, entre ellos los mamíferos, la reproducción implica cambios estructurales, funcionales y conductuales, los cuales son el resultado de la coordinación de los componentes neuroendócrinos del sistema reproductor y se inicia con la pubertad (Adams, 1988; Ojeda y Urbanski, 1988; Ramaley, 1979).

Las funciones del ovario, secreción de hormonas y la ovulación, son reguladas por la interrelación de una serie de mecanismos neuroendócrinos, en los que está involucrado el eje hipotálamo-hipófisis. El hipotálamo es el centro integrador que controla ambas funciones vía la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés), que es transportada por el sistema vascular denominado portal-hipotálamo-hipofisiario hacia la glándula hipofisiaria. Esta señal hipotalámica estimula los gonadotropos de la adenohipófisis a que sintetizen dos glucoproteínas, llamadas gonadotropinas, la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés) y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés). Ambas actúan en el ovario donde estimulan el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico y la ovulación; también estimulan la secreción de hormonas (estrógenos, progesterona, inhibina, entre otras). A su

vez, las hormonas gonadales actúan en el hipotálamo y la adenohipófisis, regulando la liberación de las gonadotropinas, a través de un mecanismo de retroalimentación hormonal (Fink, 1988) (Figura 1). Los esteroides gonadales también mantienen las condiciones para la fertilidad, por sus efectos en el comportamiento de cópula y en el desarrollo y mantenimiento del tracto reproductor (Steinetz, 1978).

La pubertad es la etapa biológica del individuo, que se presenta entre la inmadurez y la madurez sexual y en ella se producen una serie de cambios neuroendócrinos y fenotípicos. En la rata hembra la pubertad se define como el día en que se produce el rompimiento del epitelio que recubre la entrada a la vagina, la que es un cilindro epitelial desde el nacimiento y se canaliza alrededor de los 35 ó 45 días después del nacimiento. Este evento es regulado por los estrógenos secretados por el ovario; en ese momento la citología vaginal presenta las características de proestro y la ovulación se produce entre las 24 ó 48 horas posteriores a la canalización vaginal (Becún-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Diversos estudios han mostrado que durante el desarrollo prepuberal de la rata se presentan una serie de cambios morfológicos y funcionales en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, muchos de los cuales se inician desde el nacimiento y culminan con la pubertad. Ojeda y Urbanski, (1994) clasificaron la cascada de eventos que se suceden en los días cercanos a la pubertad y primera ovulación en cuatro etapas.

Anaestro

En este día se producen cambios diurnos en la liberación de la LH (aumentos bruscos en la concentración plasmática de la hormona ("picos" de mayor amplitud en la tarde)). En el ovario se observan folículos grandes, el útero no presenta líquido en su luz y su peso es bajo y la vagina se mantiene cerrada, lo que indica que la cantidad de estrógenos producidos por los folículos no es suficiente para inducir el crecimiento del útero y la ruptura del epitelio que recubre la vagina. Así mismo, no se presenta el mecanismo de retroalimentación estimulante que ejercen los estrógenos en el sistema nervioso central (SNC), y que resulta en la estimulación de la secreción preovulatoria de las gonadotropinas. En el ovario disminuye el número de receptores a la GnRH y se

incrementan los de la LH y los β -adrenérgicos (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y col., 1983; Ojeda y Urbanski, 1994).

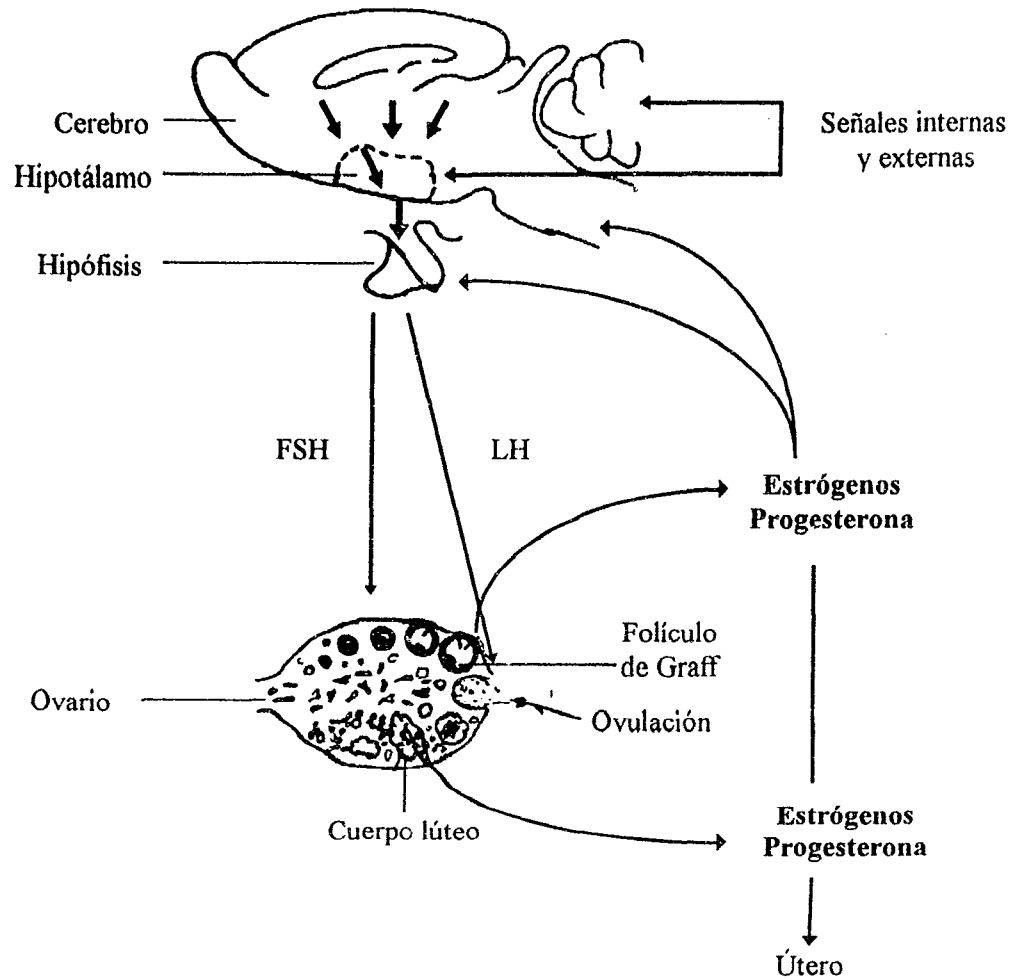


Figura 1. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Control del ciclo ovárico por la FSH (hormona folículo estimulante) y la LH (hormona luteinizante) producidas por la adenohipófisis. La secreción de las gonadotropinas está regulada por la GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas) que es sintetizada en el hipotálamo, a su vez la secreción de esta hormona es modulada por mecanismos de retroalimentación estimulante o inhibitorio que ejercen las hormonas ováricas (estrógenos y progesterona) (Tomado de Fink, 1988).

Proestro temprano

Durante esta etapa en los ovarios se observan folículos en crecimiento, en las células de la granulosa se incrementa el número de receptores a la LH y en el plasma las concentraciones de la FSH y LH aumentan gradualmente. Conforme el folículo crece, aumenta la esteroidogénesis en el ovario y se incrementa la concentración de los estrógenos en plasma; tales eventos se acompañan de un aumento en el peso del útero y de la acumulación de líquido en su luz por acción de los estrógenos; la vagina se mantiene cerrada. En el ovario el número de receptores a la LH y los β -adrenérgicos sigue en aumento y también se incrementa la concentración del péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés) (Advis y col., 1979; Ojeda y col., 1990).

Proestro tardío

En este día se observan en los ovarios folículos preovulatorios; el peso y la acumulación de líquido en el útero (útero distendido) es máximo, la vagina permanece cerrada, el frotis vaginal se caracteriza por presentar un gran número de células epiteliales nucleadas. En los ovarios el número de receptores a la FSH es mayor en relación con el anaestro y los de la LH continúan en aumento, mientras que los receptores a la GnRH disminuyen entre el anaestro y el proestro, lo cual se acompaña por el aumento de la esteroidogénesis (Smith-White y Ojeda, 1983). En el plasma las concentraciones de estradiol y de progesterona son suficientes para estimular el primer "pico" preovulatorio de las gonadotropinas (Becún-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Cuando la concentración de estrógenos es similar a la que se presenta en la tarde del proestro del animal adulto, aumenta la liberación de la GnRH y como consecuencia la secreción preovulatoria de las gonadotropinas, las que al actuar en el ovario inducen la aceleración del crecimiento y la maduración del folículo que culmina con la primera ovulación. Además, en los ovarios el número de los receptores β -adrenérgicos disminuye y la concentración del VIP es máxima (Ojeda y Urbanski, 1994).

Durante el desarrollo de los mecanismos de regulación de la función del eje hipotálamo-hipófisis que culminan con la secreción preovulatoria de las gonadotropinas destaca la modulación que ejercen los diferentes sistemas de neurotransmisión sobre la neurona que sintetiza la GnRH (Ojeda y Urbanski, 1994). Se ha mostrado que los sistemas estimulantes (colinérgico,

noradrenérgico, serotoninérgico y los aminoácidos excitadores) son activados durante los días previos al primer estro vaginal, en cambio los sistemas de péptidos opioides y GABAérgico disminuyen su actividad en dichos días (Advis y col., 1978; Carbone y col., 1992; Mena-Valdivia y col., 1995; Ojeda y Urbanski, 1994).

Estro

En este día ocurre la primera ovulación y como consecuencia, en los ovarios se observan cuerpos lúteos recién formados; el peso del útero es bajo y no hay líquido en su luz; la vagina está abierta y su citología vaginal se caracteriza por células cornificadas de forma irregular sin núcleo; las concentraciones de los estrógenos, FSH y LH en plasma son menores respecto a la tarde del proestro y la de progesterona es mayor (Ojeda y Urbanski, 1988; Ojeda y col., 1990).

Primer diestro

Durante esta etapa, en los ovarios se presentan cuerpos lúteos maduros, el útero no presenta líquido en su luz y su peso es bajo, y el frotis vaginal está constituido predominantemente por leucocitos. Las concentraciones de estrógenos, FSH y LH se mantienen bajas en comparación a la tarde del proestro y la de progesterona disminuye ligeramente (Ojeda y col., 1990).

Además de la FSH, LH y de los esteroides ováricos, existen otras hormonas que también participan en la regulación del inicio de la pubertad como son la prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH, por sus siglas en inglés), cuyas concentraciones en el plasma son bajas entre los 30-32 días de edad, pero posteriormente aumentan gradualmente. Ambas hormonas participan de manera fundamental en el inicio de la pubertad de la rata hembra, dado que se ha mostrado que actúan en el ovario donde estimulan el desarrollo folicular y la formación de los receptores a la LH en las células de la granulosa, así como la secreción de las hormonas esteroides en respuesta a las gonadotropinas (Becún-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y col., 1990; Ojeda y Urbanski, 1994; Ramaley, 1979).

Además de las hormonas antes mencionadas, las funciones de la gónada son reguladas por la inervación que recibe el ovario por el plexo ovárico, el nervio ovárico superior (simpática) y el

nervio vago (parasimpática). Se ha mostrado que la inervación simpática transporta y libera catecolaminas (noradrenalina, adrenalina y dopamina) y algunos péptidos (la sustancia P, el VIP y el neuropéptido Y) y la parasimpática acetilcolina y sustancia P, VIP, neuropéptido Y, somatostatina (Figura 2) (Domínguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1988, 1994). La información neural aferente al ovario y en particular la noradrenérgica modula la respuesta de las células foliculares a la FSH y a la LH, el crecimiento y la diferenciación del folículo, la esteroidogénesis y la ovulación (Domínguez y col., 1991; Ojeda y Urbanski, 1994).

En el animal prepúber la sección del nervio ovárico superior disminuye el número de folículos y la cuota ovulatoria del ovario desnervado (Morales y col., 1993). Además, cuando se secciona el nervio vago se incrementa la secreción de testosterona y disminuye la producción de estrógenos, sin que se observen modificaciones en la concentración de gonadotropinas en el suero (Ojeda y col., 1983). Estos resultados apoyan la idea de que la inervación que le llega al ovario modula la respuesta del órgano a la acción de las gonadotropinas. Por otra parte, se sugiere que la gónada regula la secreción de las gonadotropinas por intermedio de información neural que envía al hipotálamo y a la propia hipófisis (Domínguez y col., 1991; Ojeda y col., 1990).

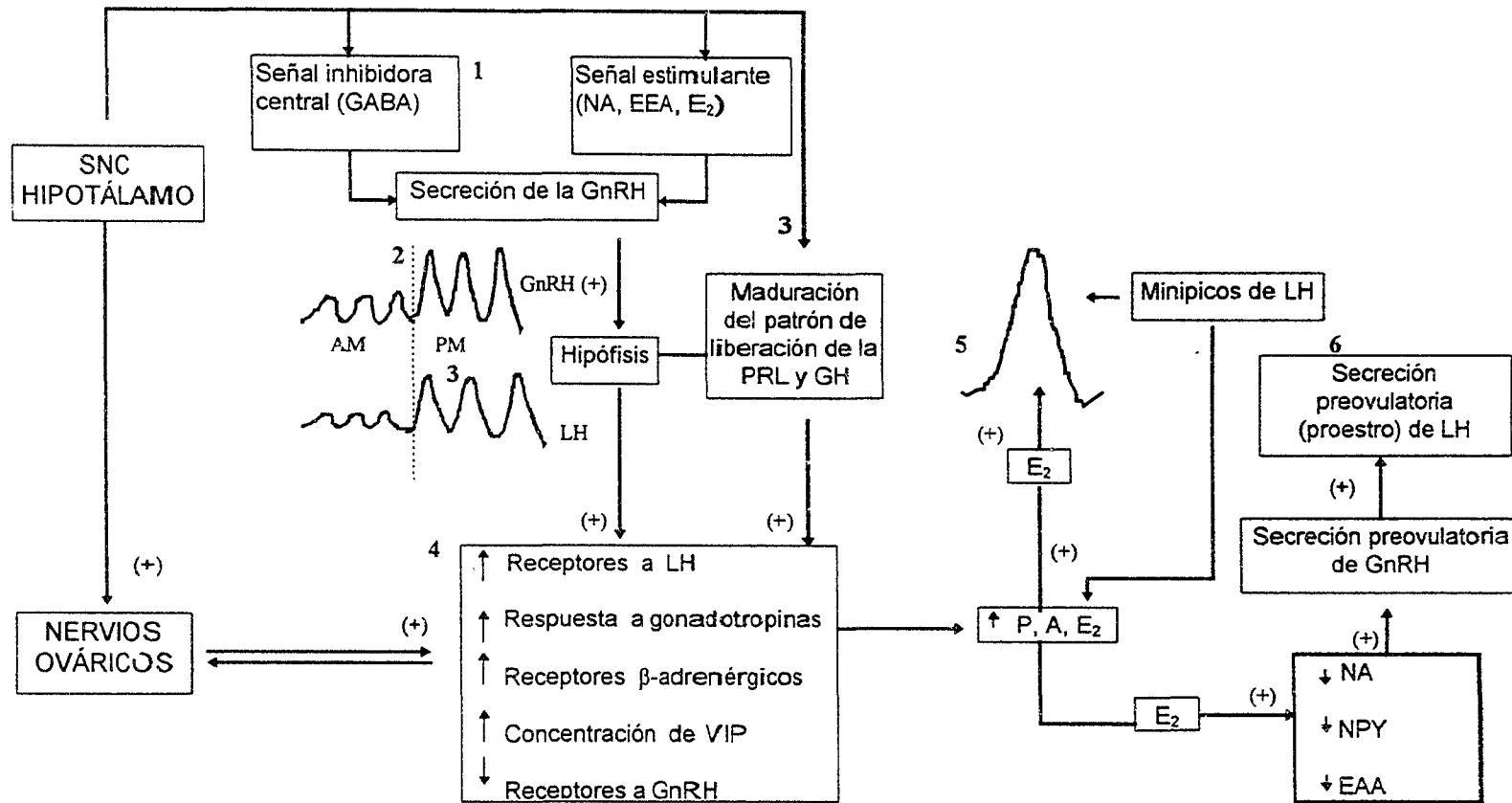


Figura 2. Representación esquemática de la cascada de eventos que dan lugar a la primera ovulación. Los números indican la secuencia en la cual se producen los eventos. (+) (Factor estimulador), SNC (sistema nervioso central), GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas), LH (hormona luteinizante), E₂ (estrógenos), P₄ (progesterona), A (andrógenos), GH (hormona de crecimiento), PRL (prolactina), VIP (péptido intestinal vasoactivo), NPY (neuropéptido Y), EAA (aminoácidos excitadores), NA (noradrenalina), GABA (ácido γ -aminobutírico) (Tomado de Ojeda y Urbanski, 1994).

Organización del hipotálamo y del sistema productor de la hormona liberadora de las gonadotropinas

La pubertad y la primera ovulación dependen de la integración y coordinación de una serie de mecanismos neuroendócrinos que se suceden en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La manifestación de tales mecanismos es el resultado del desarrollo estructural y funcional de los componentes de dicho eje, el cual se inicia incluso antes del nacimiento y se mantiene durante las diversas fases que caracterizan el desarrollo prepuberal de la rata (Ojeda y Urbanski, 1994).

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo, debajo del tálamo y a ambos lados del tercer ventrículo. Está limitado en la parte anterior por el quiasma óptico y en la posterior por los cuerpos mamilares. Con base en la distribución de sus núcleos, el hipotálamo se ha dividido en tres regiones: anterior, medio y posterior. El hipotálamo anterior lo conforman los núcleos preópticos: lateral y medial y el supraquiasmático, paraventricular, periventricular y estria terminal preóptico. El hipotálamo medio está formado por los núcleos dorsomedial, ventromedial, supraóptico, arcuato, periventricular y la eminencia media. El posterior contiene los núcleos mamilares (premamilar, lateral, medial, supramamilar e intercalado) y el posterior (Brown, 1994; Saper, 1994; Simerly, 1994).

El hipotálamo es el centro que regula la síntesis y liberación de las gonadotropinas por medio de la GnRH. Esta hormona es un péptido formado por una secuencia de diez aminoácidos. La síntesis de la GnRH se lleva a cabo en neuronas especializadas denominadas GnRHérgicas (Silverman y col., 1994).

Los grupos de neuronas que sintetizan la GnRH se han identificado en la banda diagonal de Broca, en el área septal, el núcleo de la estria terminal y en algunas áreas del hipotálamo que incluyen el núcleo paraventricular, el área preóptica medial y lateral, el área hipotalámica anterior y la zona retroquiasmática. Algunos grupos celulares se encuentran en el hipotálamo lateral y en la parte dorsal del núcleo supraóptico. Estas neuronas proyectan sus fibras hacia la eminencia media por la vía septo-preóptica-infundibular y la del haz terminal septo-preóptico. Las neuronas

GnRHégicas del área septal-preóptica proyectan fibras hacia el órgano vasculoso de la lamina terminal y también hacia algunas áreas extrahipotalámicas como la amígdala, el cerebro medio, el núcleo del raquí y la región gris periacueductal (Silverman y col., 1994).

La síntesis de la GnRH se inicia con la transcripción de la información genética y en los ribosomas adosados al retículo endoplásmico se forma un péptido precursor (pre-pro-GnRH) de aproximadamente 10,000 daltones. El precursor consta de tres regiones principales: la secuencia señal de 23 residuos de aminoácidos, que participa en la internalización del precursor a la luz del retículo, seguido por la secuencia que da origen a la GnRH, y separado por un par de aminoácidos básicos se encuentra un péptido de 56 aminoácidos, denominado "péptido asociado a la GnRH" (GAP). El precursor de la GnRH se corta por acción enzimática en el retículo endoplásmico para dar origen a la pro-GnRH, que se transfiere al aparato de Golgi donde se produce la ruptura proteolítica de la cadena y la eliminación del par de aminoácidos básicos. En esta estructura se realiza el proceso de activación, que consiste en la ciclización enzimática de la glutamina N-terminal, la ruptura del enlace gly¹¹-gly¹⁰ y la amidación de la glicina en el carbono terminal (Busby y col., 1987; Charli y col., 1991). Posteriormente, la GnRH y el GAP son almacenados en vesículas de secreción. La GnRH se transporta por el axón, hasta la terminal nerviosa que llega a la eminencia media y se libera al sistema de vasos portal hipotalámico-hipofisiario. La liberación de esta hormona se realiza por exocitosis, en respuesta a cambios en los potenciales de acción de la membrana, que permiten la apertura de los canales de Ca₂⁺ dependientes de voltaje. Como resultado de la entrada de calcio se activan las enzimas proteolíticas que degradan la membrana plasmática y la GnRH es liberada hacia la eminencia media y transportada a la adenohipófisis por el sistema portal-hipotalámico-hipofisiario (Charli y col., 1991).

En la adenohipófisis la GnRH se une en los gonadotropos por medio de receptores membranales específicos y activa a la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C. Como resultado de la activación de estos sistemas enzimáticos se forman moléculas que actúan como segundos mensajeros, entre los que se encuentran el adenosin monofosfato cíclico (AMPc), el fosfatidil inositol (IP), diacil glicerol (DAG) y se produce la movilización de calcio extra e intracelular.

Estos mensajeros activan al sistema de protein-cinasa C, lo que se traduce en el estímulo para la síntesis y liberación de la FSH y LH (Conn, 1994; Fink, 1988).

La FSH y la LH son dos hormonas glucoproteicas secretadas por la adenohipofisis que están formadas por dos cadenas de polipéptidos glucosilados (α y β), unidas en forma no covalente. La estructura de la subunidad α es común para ambas gonadotropinas, mientras que la subunidad β es específica para cada hormona y le confiere la especificidad biológica. La cadena α contienen entre 89 y 90 aminoácidos. Las cadenas α y β de la FSH poseen residuos de carbohidratos (manosa, N-acetilglucosamina, galactosa y fructosa) y de ácido siálico adheridas a la asparagina, estos componentes le confieren a la FSH sus propiedades fisicoquímicas (peso molecular y punto isoelectrico) y fisiológicas (capacidad de unión a su receptor membranal específico y actividad biológica) (Bousfield y col., 1994; Ulloa-Aguirre, 1991).

Diversos estudios experimentales han permitido la caracterización de diferentes formas moleculares (isoformas) de las gonadotropinas presentes en la adenohipofisis de los mamíferos. En función de su punto isoelectrico, en la hipofisis de la rata se han identificado seis isoformas de la FSH. En estudios *in vitro* se ha mostrado que la actividad biológica de estas moléculas varía dependiendo del contenido de ácido siálico. Cuando la incorporación de residuos de ácido siálico en la molécula aumenta (isoformas ácidas), se incrementa el tiempo de permanencia de la hormona en la circulación, pero disminuyen la capacidad de unión a su receptor y la actividad biológica, mientras que en las formas con menor contenido de ácido siálico, su actividad biológica es mayor (Ulloa-Aguirre y col., 1986, 1988).

Se señala que en la rata existen diferencias en la concentración de las isoformas hipofisarias relacionadas con el sexo o durante el desarrollo prepuberal del animal. En la etapa prepuberal de la rata hembra predominan las formas ácidas, mientras que en el día de la apertura vaginal o previo al pico preovulatorio de la LH disminuyen las formas ácidas y se incrementan las básicas, mientras que en la rata macho el comportamiento es inverso (Ulloa-Aguirre y col., 1986, 1988). Se sugiere que la síntesis y liberación de las isoformas de la FSH está regulada directa o indirectamente por la interacción de las hormonas gonadales y de neuromoduladores como la

GnRH. Este péptido estimula la síntesis de las isoformas ácidas, debido a que facilita la incorporación de ácido siálico a las cadenas que conforman la molécula de la FSH, en cambio el estradiol reduce la adición de estos residuos y la testosterona aumenta el proceso de sialización (Chappel y col., 1983).

Ambas gonadotropinas estimulan el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico y la síntesis de esteroides (progesterona, estrógenos y testosterona), de hormonas no esteroides (activina e inhibina) y de moléculas como el factor de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1), el factor de crecimiento de los fibroblastos (FGF) y los factores transformantes α y β (TGF α TGF β) (Hillier, 1994).

Las gonadotropinas son necesarias para que el folículo ovárico inicie su desarrollo y se incorpore al grupo de folículos en crecimiento (Domínguez y col., 1991; Hillier, 1994). La FSH estimula el crecimiento del ovocito y la proliferación de las células de la granulosa. En las células de la teca, la LH estimula la síntesis de andrógenos, mientras que en las células de la granulosa la FSH incrementa la actividad de la enzima aromatasa, lo que induce aumento de la secreción de los estrógenos. Conforme el folículo madura, las células de la granulosa adquieren receptores a la LH por la acción sinérgica de la FSH y de los estrógenos. Ambas gonadotropinas actúan conjuntamente en la regulación del proceso de esteroidogénesis (Domínguez y col., 1991; Fink, 1986, Hillier, 1994).

La FSH modula el proceso de foliculogénesis en el ovario. En primer lugar esta gonadotropina estimula el crecimiento del ovocito que posee receptores a dicha hormona y está rodeado por células foliculares aplanadas (folículo primordial), posteriormente las células foliculares adquieren una forma cúbica y se inicia la multiplicación de estas células y se constituye el folículo en crecimiento, conformado por el ovocito y varias capas de células de la granulosa. Al parecer las etapas iniciales del desarrollo del folículo no son reguladas por las gonadotropinas, sin embargo se ha mostrado que la administración de estas hormonas estimula el crecimiento de los folículos primarios (Richards, 1980). A medida que el folículo crece adquiere la capacidad de sintetizar hormonas esteroides y conjuntamente se inicia la formación de pequeños espacios entre

las células (cuerpos de Call-exner), los que tienden a unirse y formar una cavidad llamada antro. En el folículo en crecimiento la FSH estimula la expresión de sus propios receptores y los de la LH en las células de la granulosa. Por acción de estas gonadotropinas y de los estrógenos el folículo alcanza el estado preovulatorio (folículo capaz de liberar al ovocito), y cuando su tamaño es máximo disminuye la proliferación de las células de la granulosa, mientras el antro continúa creciendo (Domínguez y col., 1991).

La hormona luteinizante una vez que se une a los receptores localizados en la membrana de la célula de la teca, activa la enzima adenilato ciclasa e incrementa la recaptura del colesterol (precursor de las hormonas esteroideas). En la mitocondria de la célula de la teca, el colesterol es hidroxilado en el carbono 20-22, lo que permite el corte de la cadena lateral y que se forma un compuesto de veintiún carbonos llamado pregnenolona. Como resultado de la acción de la LH en las células de la teca se activan tres componentes enzimáticos: a) citocromo P₄₅₀ (proteínas que hidroxilan y cortan enlaces C-C, b) flavoproteína (flavina adenina dinucleótido (FAD⁺), c) proteína de tipo hemo (actúa como intermediario entre el P₄₅₀ y el FAD). En el retículo endoplásmico liso la pregnenolona puede ser biotransformada por dos rutas esteroideogénicas, la $\Delta 5$ o la $\Delta 4$. En la ruta $\Delta 5$, la pregnenolona se transforma en 17 α -hidroxipregnenolona; posteriormente en dehidroepiandrosterona por acción del complejo enzimático citocromo P₄₅₀ C₁₇ (la 17 α -hidroxilasa y la C₁₇₋₂₀-liasa) y después es transformada a androstenediona por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa. En cambio, en la ruta $\Delta 4$ la pregnenolona es convertida a progesterona (P₄) por acción de la enzima 17 α -hidroxilasa y a su vez dicha hormona es convertida a 17 α -hidroxiprogesterona por el citocromo P₄₅₀. Esta última hormona es transformada a androstenediona por la C₁₇₋₂₀ liasa y posteriormente a testosterona. La androstenediona y la testosterona (andrógenos) difunden a través de la membrana basal a las células de la granulosa donde son aromatizados a estrógenos por la enzima aromatasa, que se activa por la acción de la FSH (Figura 3) (Brodie, 1983; Eckstein, 1977).

La FSH participa en la regulación de la síntesis de los estrógenos a partir de los andrógenos, debido a que éstos son aromatizados por la enzima aromatasa activada por la FSH. La unión de la FSH a su receptor de membrana en la célula de la granulosa, activa a la enzima

adenilato ciclasa e induce la transformación del adenosin trifosfato (ATP) a AMPc. Esta molécula mensajera activa al sistema de aromatasas (citocromo P₄₅₀ microsomal) que hidroxilan el carbono diecinueve, elimina un grupo metilo en el carbono diez, proporciona la estructura aromática al anillo A de los andrógenos y forma un esteroide de dieciocho carbonos (Figura 3) (Domínguez y col 1991; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Pedernera, 1993).

En el proceso de ovulación, la LH activa a las enzimas proteolíticas que degradan los desmosomas en las células de la granulosa y de la teca, así como las fibras de colágena que rodean al folículo. Otra de las funciones de la gonadotropina es la inducción de la luteinización de las células de la teca, inhibición de la proliferación de las células foliculares y de la secreción de estrógenos. Como resultado de dichos procesos se inicia la ruptura del folículo y la formación del cuerpo lúteo que secreta principalmente P₄ (Hillier, 1994).

La mayoría de la población total de folículos que se encuentran en el ovario, sufre un proceso de degeneración llamado atresia. A la atresia se le considera un fenómeno característico de los mamíferos y de los vertebrados no mamíferos. Este proceso se presenta en cualquier etapa del desarrollo folicular, aún desde la etapa fetal y en la vida adulta. El inicio de la atresia puede estar determinado por alteraciones en el ovocito, que se traduce en la pérdida de la capacidad para mantener el control metabólico del folículo. Dichas alteraciones metabólicas preceden las modificaciones en las células de la teca (incremento del tamaño del núcleo, del citoplasma y fragmentación de la membrana basal) y en las células de la granulosa (fragmentación del DNA, picnosis, pérdida de la capacidad de unión entre las células) e invasión del antro folicular por las células de la granulosa. Otros de los eventos que caracterizan la atresia folicular es la pérdida gradual de los receptores a la FSH y LH, lo que se traduce en la disminución de la capacidad de aromatización de los andrógenos y como consecuencia disminuye la secreción de estrógenos por este tipo de folículos (Domínguez y col., 1991; Greenwald y Roy, 1994).

A la FSH y LH se les considera factores de supervivencia folicular (Domínguez col., 1991; Hsueh y col., 1994; Greenwald y Roy, 19994). En la rata adulta la administración de anticuerpos a las gonadotropinas o la hipofisectomía, en la mañana del proestro aumenta el índice de atresia en

los folículos preovulatorios. En el animal prepúber hipofisectomizado la administración de FSH disminuye la muerte celular programada (apoptosis) en las células de la granulosa y la fragmentación del DNA en las células del ovario (Billig y col., 1994 cit. en Hsueh y col., 1994). Además, se ha mostrado que la administración de PMSG incrementa el número de folículos sanos y disminuye la incidencia de atresia en los folículos preovulatorios (Villavicencio y Domínguez, 1993).

Hsueh y col. (1994) mostraron que la apoptosis es el mecanismo molecular fundamental en la atresia folicular, el cual está vinculado a los factores de crecimiento como elementos que participan en la regulación del inicio de la atresia. Algunos de los factores que intervienen en la sobrevivencia del folículo o supresión de la apoptosis incluye al factor de crecimiento epidermal (EGF), al transformante α ($TGF\alpha$), al de fibroblastos básico (bFGF), al parecido a la insulina (IGF-I), las gonadotropinas y los estrógenos. Así mismo, la GnRH de origen ovárico, la activina, inhibina, interleucina 6 (IL-6) y los andrógenos son considerados factores atretogénicos (inductores de atresia).

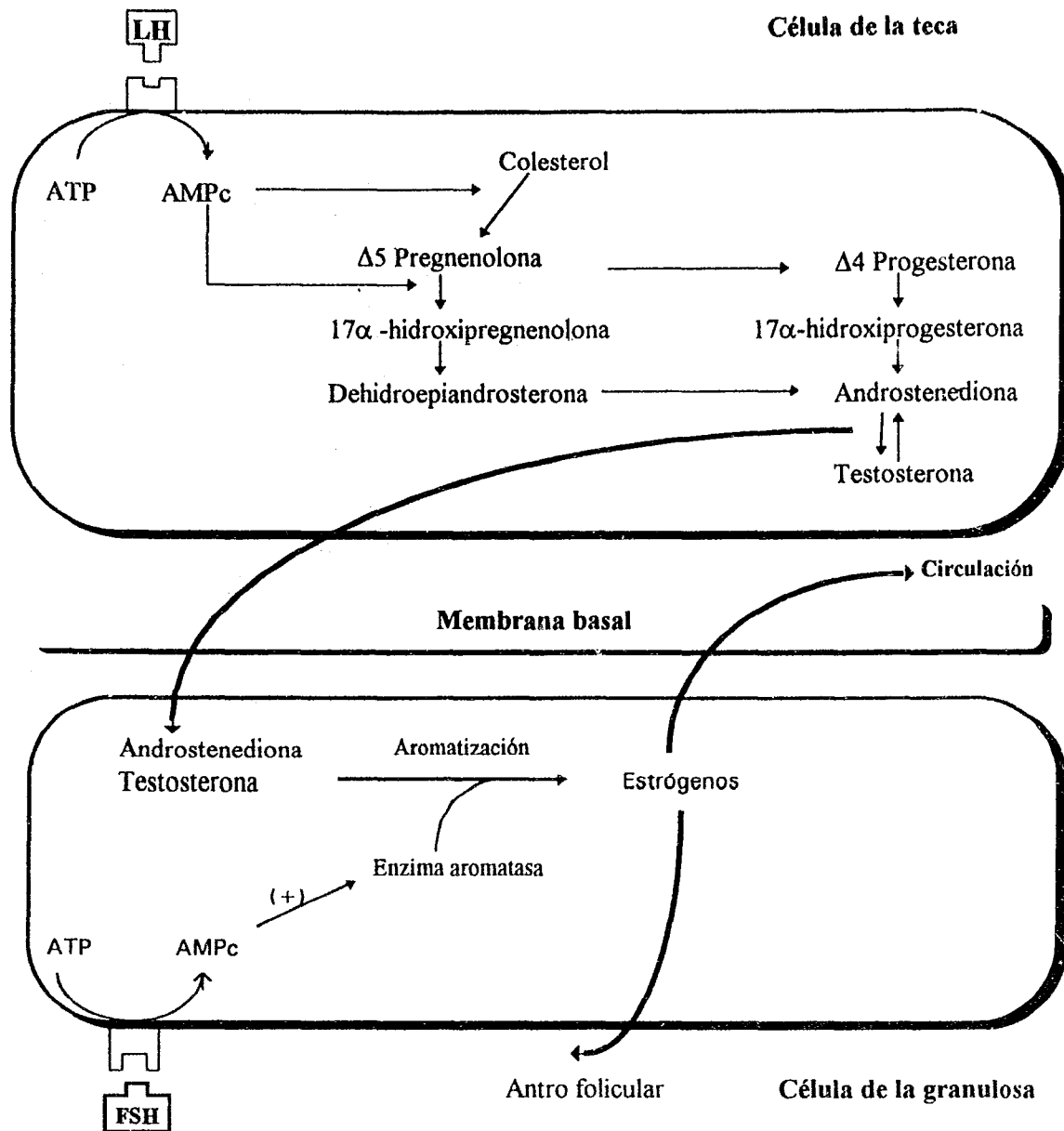


Figura 3. Modelo de la doble célula-doble hormona que explica la síntesis de los esteroides en el ovarios. Los andrógenos se secretan en las células de la teca por acción de la LH. En las células de la granulosa los andrógenos son aromatizados a estrógenos, los cuales se liberan a la circulación o al antro folicular. (+) (Factor estimulantes), LH (Hormona luteinizante), FSH (hormona foliculo estimulante), ATP (adenosin trifostato), AMPc (adenosin monofosfato cíclico) (Tomado y modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994).

Regulación de la secreción de la GnRH

En la regulación de la secreción de la GnRH y las gonadotropinas participan los diferentes sistemas de neurotransmisión como el catecolaminérgico (noradrenérgico, dopaminérgico), colinérgico, GABAérgico y serotoninérgico (Franshini, 1970; Kordon y col., 1980; Kordon y Glowinski, 1972; Kordon y col., 1994;), los aminoácidos excitadores como el glutamato y el aspartato (Mena-Valdivia y col., 1995; Carbone y col., 1992) y el sistema de péptidos opioides (Mena-Valdivia y col., 1995; Wilkinson y Bhanot, 1982).

Con el empleo de técnicas de inmunohistoquímica, se ha mostrado que en el núcleo periventricular del hipotálamo y en el núcleo arcuato existe un gran número de neuronas dopaminérgicas, y en dichas regiones se ha detectado la presencia de fibras nerviosas que poseen GnRH en proximidad a las neuronas dopaminérgicas, por lo que se sugiere que existe una conexión entre el soma de la neurona dopaminérgica y la terminal GnRHérgica, o inervación dopaminérgica en esta región. En la banda diagonal de Broca, en el área preóptica y en la región media y ventrolateral de la eminencia media se ha observado interacción entre las fibras dopaminérgicas y las que poseen GnRH. Sin embargo, en el tercer ventrículo y en la región rostral de la eminencia media la sobreposición de fibras es mayor y en la región caudal y en el área subependimal de la eminencia media el contacto es limitado (Jennes y col., 1983).

Los cuerpos celulares que sintetizan noradrenalina están localizados en estructuras extrahipotalámicas, principalmente en el *locus coeruleus* y el bulbo raquídeo, conforman dos haces nerviosos principales, la dorsal y la ventral (Bronwn, 1994). Los somas noradrenérgicos que constituyen la vía dorsal se localizan en el *locus coeruleus* y envían sus fibras nerviosas a la región de la espina dorsal, el cerebelo, la corteza y el hipocampo. La vía ventral se localiza en el área tegmental ventral e inervan al cerebro medio del órgano vasculoso de la lamina terminal y al hipotálamo (Weiner y Molinoff, 1994). En el hipotálamo la distribución de la noradrenalina se concentra en la parte central y rostral de la eminencia media, se extiende a la región del surco tubero-infundibular y rodea el área dorsomedial de la *pars tuberalis* de la hipófisis. En la porción lateral del tercer ventrículo y en la capa subependimal de la eminencia media existe una

sobreposición de fibras noradrenérgicas y GnRHérgicas y ocasionalmente se ha descrito el contacto entre el soma de la células que sintetizan la GnRH y las fibras noradrenérgicas (Jennes y col., 1982).

En la banda diagonal de Broca y en los núcleos periventricular y supraquiasmático del hipotálamo, se localizan neuronas que sintetizan el ácido γ -aminobutírico (GABA) y las terminales nerviosas que poseen GABA se localizan entre la banda diagonal y en la región prequiasmática. En la eminencia media ocasionalmente se ha observado comunicación sináptica entre las fibras GABAérgicas y GnRHérgicas, mientras que en el órgano vasculoso de la lamina terminal existe mayor número de contactos entre el soma de la neurona productora de GnRH y las fibras GABAérgicas (Jennes y col., 1983).

Con base en las evidencias anatómicas se sugiere que la función de la neurona GnRHérgica es regulada directamente por los diferentes sistemas de neurotransmisión o de forma indirecta vía la interacción de estos sistemas. En el órgano vasculoso de la lamina terminal, las terminales GnRHérgicas establecen una comunicación sináptica con las fibras serotoninérgicas. En el área preóptica hipotalámica anterior existe una comunicación entre el soma de la neurona GnRHérgica y las terminales nerviosas dopaminérgicas, GABAérgicas, noradrenérgicas y serotoninérgicas. En cambio, en la en la eminencia media existe la interacción entre las terminales nerviosas de la neurona GnRHérgica y las de los sistemas de neurotransmisión antes mencionados (Jennes y col., 1982, 1983).

Se ha mostrado que en la eminencia media el efecto que ejercen el GABA, la noradrenalina y la serotonina sobre la secreción de la GnRH, puede estar modulado por la neurona dopaminérgica, dado que existe una comunicación entre las terminales nerviosas de dichas neuronas y el soma de la neurona dopaminérgica (Jennes y col., 1982, 1983).

Además de las evidencias anatómicas que apoyan la participación de los sistemas de neurotransmisión en la regulación de la secreción de la GnRH, también se han analizado los cambios en la concentración de los neurotransmisores y en la actividad neuronal en diferentes

regiones del cerebro. En la rata adulta la concentración de noradrenalina en la eminencia media se incrementa en la tarde del proestro, previo al "pico" preovulatorio de la LH, mientras que la de dopamina, serotonina y la actividad de la neurona dopaminérgica disminuyen y aumenta la actividad del sistema serotoninérgico. En cambio, en los otros días del ciclo no se observan cambios. Estos resultados han permitido sugerir que la noradrenalina ejerce un efecto estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que modulan la secreción de LH y la ovulación, mientras que la dopamina participa de manera inhibitoria y la función que se le atribuye al sistema serotoninérgico es estimulante o inhibitoria (Kerdelhué y col., 1989; Parisi y col., 1983; Rance y col., 1981). La controversia sobre la participación del sistema serotoninérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas posiblemente está vinculada al medio ambiente hormonal que prevalece en el animal en momento en que se realizan los diferentes estudios.

Organización del sistema serotoninérgico

Los cuerpos neuronales de las terminales nerviosas que contienen serotonina se localizan en los núcleos del raqué que están constituidos por nueve paquetes celulares (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B8 y B9) localizados en la parte anterior del mesencéfalo (Frazer y Hensler, 1994; Pranzatelli, 1992; Takeuchi, 1988). Con base en la distribución de estas células, el núcleo del raqué se divide en dorsal, medial y del puente. El núcleo dorsal corresponde a los paquetes B7 y B6 que se localizan en la porción ventral de la sustancia gris periacueductal, el medial que lo conforman el paquete B8 y parte del B9, situado entre el núcleo central superior y la línea del mesencéfalo, y el núcleo del puente que comprende del B1 al B5 situado más caudalmente (Figura 4) (Frazer y Hensler, 1994).

Las fibras serotoninérgicas que se originan en los núcleos dorsal y medial del raqué, inervan diferentes estructuras del SNC, entre las que se encuentran el hipotálamo, la corteza cerebral, el hipocampo, la amígdala, las áreas rostrales del sistema límbico y la eminencia media (Takeuchi, 1988). En el hipotálamo las fibras serotoninérgicas inervan el área preóptica medial, los núcleos supraquiasmático, arcuato, paraventricular y mamilares (medial, premamilar, supramamilar y

lateral). La información serotoninérgica del puente envía sus proyecciones hacia el bulbo raquídeo y la médula donde tienen tractos descendentes que terminan a diferentes niveles de la médula espinal (Soghomonian y col., 1988).

La fuente principal de serotonina en el hipotálamo se origina en el núcleo dorsal y medial del rafe. Las fibras serotoninérgicas que ascienden desde el núcleo medial inervan principalmente al área preóptica medial, el área hipotalámica anterior y el núcleo supraquiasmático (Van de Kar y Lorens, 1979), en tanto el núcleo dorsal envía sus proyecciones principalmente al área hipotalámica anterolateral, la eminencia media y al núcleo arcuato (Van de Kar y Lorens, 1979; Villar y col., 1984).

En algunas especies se ha detectado la presencia de fibras serotoninérgicas en los lóbulos intermedio y posterior de la hipófisis. En la rata existe un mayor número de inervación serotoninérgica en la región posterior de la glándula en comparación con la parte intermedia y no se han identificado este tipo de fibras en la parte anterior de la hipófisis (Saland y col., 1986). Sin embargo, algunos autores plantean que estas fibras sí existen en la adenohipófisis (Westlund y Childs, 1982).

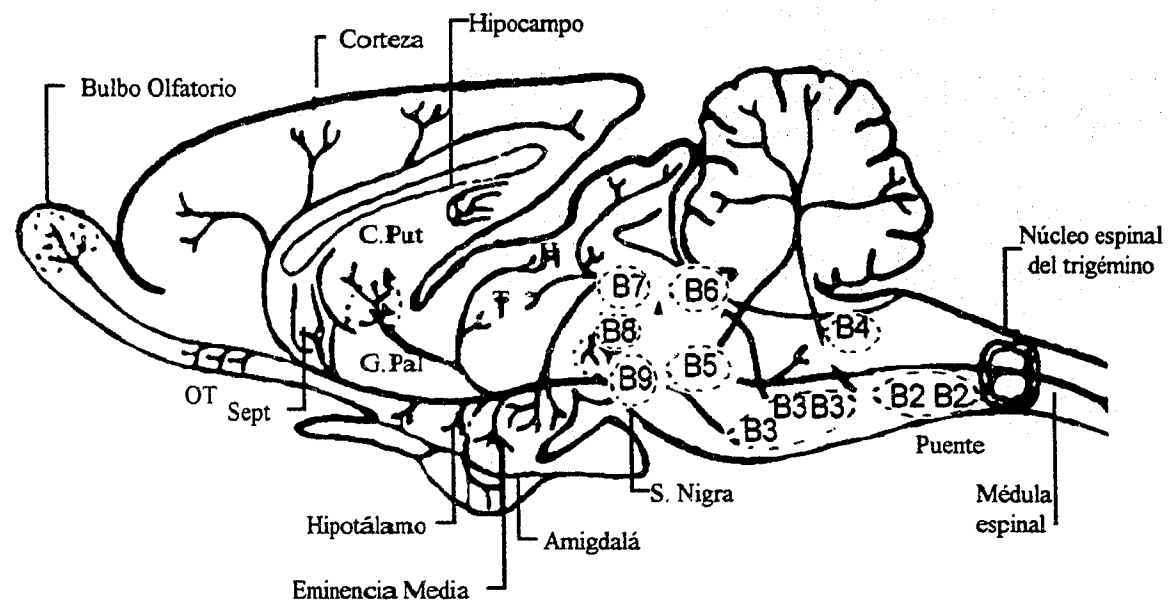


Figura 4. Localización de los paquetes celulares que sintetizan la serotonina. Corte sagital del cerebro de la ratona en el que se muestra la localización de los somas de las neuronas productoras de serotonina (B1, B2, B3, B4, B5, B6, B7, B9) y la innervación de las diferentes estructuras del sistema nervioso central. OT (Tubérculo olfatorio), Sept (septum), C.Put (núcleo caudado-putamen), G. Pal (*globus pallidus*), T (tálamo), H (habénula) y S. Nigra (*sustancia nigra*) (Tomado de Frazer y Hensler, 1994).

Existen diferencias estructurales entre las neuronas que forman los núcleos dorsal y medial del raquí (Frazer y Hensler, 1994). Los axones serotoninérgicos que se originan en el núcleo medial son gruesos y poseen varicosidades grandes y de forma esférica, mientras que los axones de las neuronas del núcleo dorsal son muy delgados y presentan varicosidades muy pequeñas o de forma alargada. Estas diferencias posiblemente están vinculadas al efecto diferencial que ejercen algunos neurotóxicos del sistema serotoninérgico sobre estos grupos celulares. Cuando se administra en estos núcleos la p-cloroanfetamina (inhibidor de la triptofano-hidroxilasa, enzima limitante de la síntesis de la serotonina), el número de neuronas serotoninérgicas disminuye un 26 % en el núcleo medial y hasta un 95 % en el dorsal. Estas evidencias llevaron a los autores a sugerir que las neuronas serotoninérgicas del raquí dorsal son más susceptibles a la acción de los neurotóxicos (Bendotti y col., 1990; Molliver, 1987 cit. en Frazer y Hensler, 1994; Jacobs y Azmitia, 1992).

Además de las diferencias en la distribución de las fibras serotoninérgicas en el SNC se han identificado cuatro tipos de receptores a serotonina: 5-HT₁, 5-HT₂, 5-HT₃ y el 5-HT₄. A su vez cada tipo de receptor posee subtipos que son designados por letras. Los dos primeros están presentes desde el nacimiento y su número varía en las diferentes regiones del cerebro (Frazer y Hensler, 1994; Pranzatelli, 1992). En el hipotálamo están presentes receptores del tipo 5-HT_{1a}, 5-HT_{1b}, 5-HT_{1c}, 5-HT_{1d}, y 5-HT₂, en la corteza cerebral y sustancia nigra del tipo 5-HT_{1d} y en el hipocampo el 5-HT₄ (Bockaert y col., 1992). El receptor 5-HT₃ se localiza en neuronas periféricas como son el ganglio cervical, nervio vago y cordón espinal (Kia y col., 1995).

Los receptores a serotonina se localizan tanto en la región presináptica (en el cuerpo celular, la terminal nerviosa y en la dendrita de la neurona serotoninérgica), como en el área postsináptica. Cuando se administra la 5,7-dihidroxitriptamina (neurotóxico de las neuronas serotoninérgicas) en el núcleo del raquí, disminuye el número de receptores a serotonina del tipo 5-HT_{1a} en dicha área, lo que permite sugerir que dicho receptor está presente en el soma de las neuronas serotoninérgicas. El mismo tratamiento no modifica el número de receptores del tipo 5-HT_{1a} en el hipocampo, la amígdala, el hipotálamo y el septum, lo que apoya la idea de que dicho receptor está localizado en la región postsináptica (Frazer y Hensler, 1994). Así mismo, el receptor tipo 5-HT₃ se localiza en diferentes áreas del SNC, predominantemente en la región

presináptica o en la terminal nerviosa de las neuronas dopaminérgica, noradrenérgica y colinérgica (Blandina y col., 1991; Kidd y col., 1993).

Los estudios encaminados a analizar el desarrollo del sistema serotoninérgico han mostrado que las neuronas serotoninérgicas se encuentran entre las primeras células que se desarrollan y reorganizan en el SNC (Lidov y Molliver, 1982). En la rata, a partir del día 13 y hasta el 21 de vida intrauterina, las neuronas serotoninérgicas cambian de neuroblastos bipolares a neuronas con dendritas diferenciadas. Los paquetes celulares que conforman al núcleo del raqué dorsal y medial se desarrollan a partir de dos subgrupos, el dorsal y el ventral. El subgrupo dorsal es más grande y se localiza cerca de la luz del acueducto. En el día 15 el paquete B7 se diferencia (núcleo dorsal) y la porción caudal da origen al B4 y B6 y posiblemente a parte del B5 (núcleo del puente). El subgrupo ventral se diferencia cerca del día 17, y forma el B8 (núcleo medial) y en el día 18 se inicia la diferenciación del B9. En la región caudal del mesencéfalo, uno o dos días después de que se forma el complejo del B4-B9, se inicia la diferenciación de los paquetes del B1 al B3. En el día 19 se produce la diferenciación final de los paquetes celulares que conforman al núcleo del raqué (Lidov y Molliver, 1982; Wallace y Lauder, 1983).

La inervación serotoninérgica de las diferentes estructuras que conforman al SNC, se inicia inmediatamente después de que aparecen los complejos celulares B4-B9 y culmina alrededor de la tercera semana del desarrollo postnatal (Wallace y Lauder, 1983). Entre los días 13 y 15 del desarrollo prenatal se establece la inervación de la región del mesencéfalo, diencefalo (zona intermedia, zona marginal, zona inserta, complejos mamilares y área ventral del tálamo). Entre los días 15 y 16 de vida intrauterina se identifica un gran número de fibras en la región del hipotálamo lateral y en la región del núcleo supraóptico. Durante el día 17 estas fibras inervan la región del telencefalo (*globus pallidus*), la región septal, el septum y el área paraventricular del hipotálamo y el núcleo supraquiasmático y en el día 18 la región del hipotálamo anterior y el área septal, la zona medial de la neocorteza, y a medida que el animal madura se completa la inervación de las capas superiores de la corteza (Wallace y Lauder, 1983).

Además de las evidencias antes señaladas, en la rata se ha mostrado que la concentración de serotonina en el núcleo del rafe es alta desde el nacimiento y no se modifica durante el desarrollo prepuberal. En cambio, la concentración de la amina en el área hipotalámica anterior es baja durante la primera semana de vida y se incrementa conforme el animal madura (Watts y Stanley, 1984). Estos resultados apoyan la idea de que al nacimiento se ha completado el desarrollo del núcleo del rafe, aunque existe un número reducido de neuronas serotoninérgicas funcionales en las diferentes regiones del sistema nervioso central. Así mismo, se ha reportado que los receptores a serotonina en el área preóptica del hipotálamo, aumentan desde el día 5 hasta el 37 del desarrollo postnatal (Becú-Villalobos y Libertun, 1986).

En el cerebro de la rata se han detectado receptores a serotonina del tipo 5-HT₂ desde el día diecinueve de gestación, y alcanza su máximo alrededor de la segunda o tercera semana postnatal. En el animal prepúber la distribución de los sitios de unión a la serotonina en el hipotálamo, hipocampo, cuerpo estriado y cerebro anterior es semejante a la que se presenta en el animal adulto (Becú-Villalobos y Libertun, 1986; Morilak y Ciaranello, 1993).

Además de los cambios descritos en el sistema serotoninérgico durante el desarrollo de la rata, también se ha mostrado que la síntesis de serotonina es menor durante la vida fetal y se incrementa entre el día del nacimiento y el día 50 de edad (Kato, 1960; Becú-Villalobos y Libertun, 1986). El proceso de síntesis de esta amina se lleva a cabo por medio de la enzima triptofano hidroxilasa, la que hidroxila el carbono cinco de la molécula del aminoácido triptofano (aportado por las proteínas consumidas en la dieta) y lo transforma en 5-hidroxitriptofano; la activación de dicha enzima requiere de un cofactor, llamado pteridina reductor (donador de electrones). Posteriormente el 5-hidroxitriptofano, por acción de la enzima ácido aromático L-amino descarboxilasa, se convierte en 5-hidroxitriptamina (serotonina (5-HT)) (Figura 5). La primera enzima únicamente se localiza en las células que producen la serotonina y la segunda se encuentra incluso en las neuronas catecolaminérgicas. La diferencia que existe en la distribución de tales enzimas radica en las condiciones de pH, la disponibilidad del sustrato o del cofactor que es requerido para la activación óptima de cada una de ellas (Frazer y Hensler, 1994).

La enzima encargada de catabolizar a la serotonina es la monoamina oxidasa (MAO), que la transforma a 5-hidroxiindolacetaldehído, el cual es oxidado por acción de la enzima aldehído deshidrogenasa y forma el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA), principal metabolito de la serotonina (Figura 5). El 5-hidroxiindolacetaldehído también puede ser reducido por la enzima aldehído reductasa, lo que da lugar a la formación del alcohol 5-hidroxitriptofol. Existen dos isoenzimas que catabolizan a la serotonina, la MAO tipo A y la tipo B, ambas enzimas se localizan en la membrana de las mitocondrias de la neurona. La serotonina es metabolizada preferentemente por el tipo A (Frazer y Hersler, 1994). Según Kerdelhué y col. (1989) y Shannon y col. (1986) la transformación del neurotransmisor a su principal metabolito, es un indicador de la actividad neuronal.

La síntesis de la serotonina es regulada por diversos mecanismos como es la competencia entre el triptofano y otros aminoácidos de tipo neutro (fenilalanina, leucina, metionina), por el acarreador que transporta estos aminoácidos al interior del cerebro a través de la barrera hematoencefálica. Así mismo, la disminución en la concentración del triptofano por una menor incorporación de dicho aminoácido en la dieta, induce la disminución en la concentración de serotonina. Otro mecanismo es la disminución de la concentración del cofactor requerido para la activación de la triptofano hidroxilasa (Frazer y Hensler, 1994).

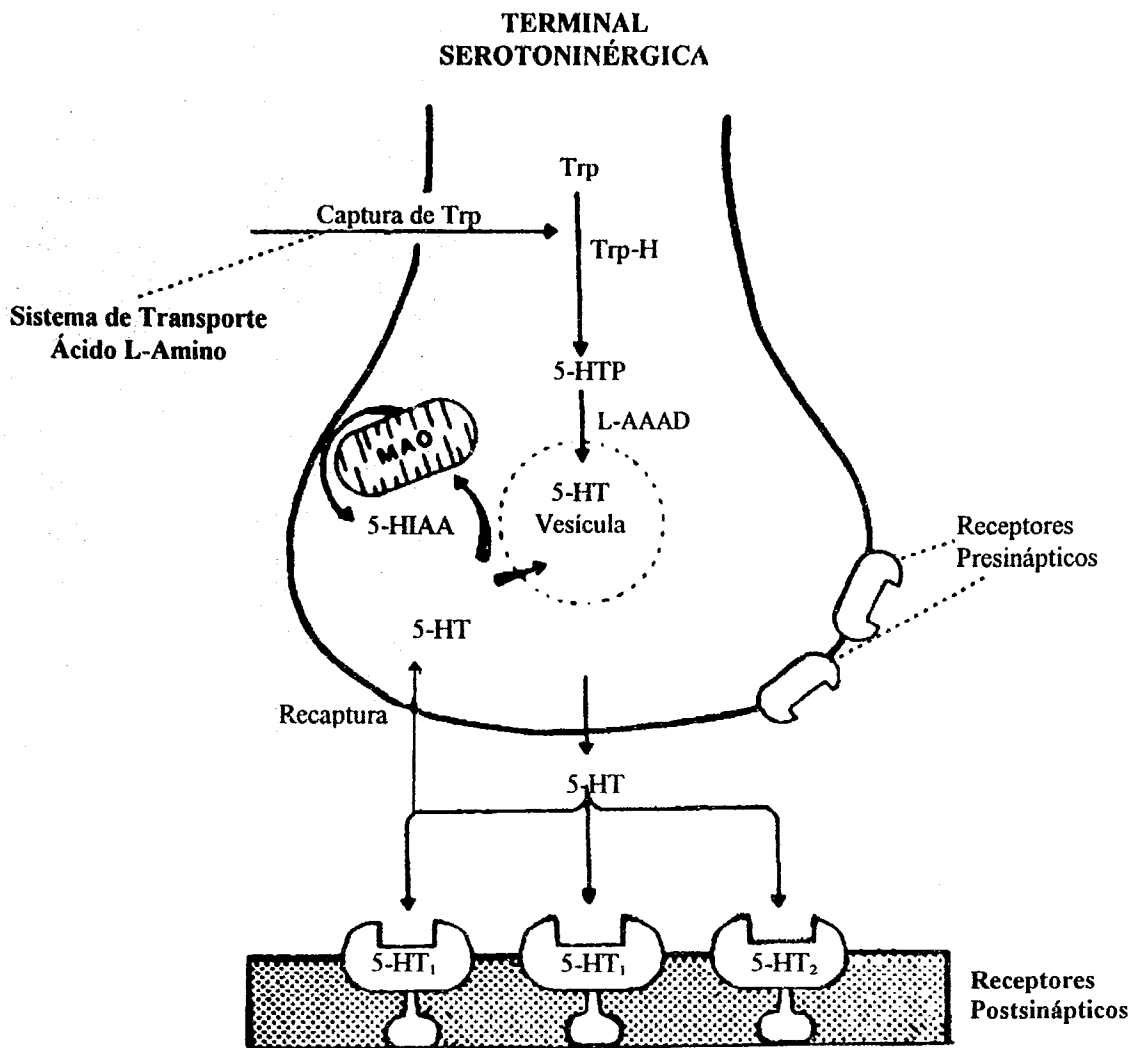


Figura 5. Representación esquemática de los pasos de la síntesis y el catabolismo de la serotonina en la neurona. Trp (Aminoácido triptofano), Trp-H (enzima triptofano hidroxilasa), 5-HTP (5-hidroxitriptofano), L-AAAD (enzima ácido L-amino aromático descarboxilasa), serotonina (5-HT), MAO (enzima monoamina oxidasa), ácido 5-HIAA (5-hidroxiindolacético) (Tomado de Müller y Nisticó, 1988).

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

Diversas evidencias anatómicas apoyan la idea de que el sistema serotoninérgico modula la secreción de las gonadotropinas por su interacción con la neurona GnRHérgica. Por técnicas de inmunohistoquímica se ha mostrado que las fibras serotoninérgicas y el soma de la neurona GnRHérgica hacen sinapsis en el área hipotalámica anterior, y que estas fibras y las que liberan la GnRH interactúan en la eminencia media (Jennes y col., 1982; Kiss y Halász, 1985). Lo antes mencionado llevó a los autores a pensar que este sistema de neurotransmisión regula la síntesis y liberación de la GnRH y de las gonadotropinas. Sin embargo, es posible que también la acción de la amina en estos eventos sea por una vía indirecta, al actuar sobre otro sistema de neurotransmisión y así este último module la actividad de la neurona productora de la GnRH. Entre los posibles sistemas de neurotransmisión intermediarios se encuentran el dopaminérgico, noradrenérgico y GABAérgico (Jennes y col., 1983; Morello y Taleisnik, 1988; Morello y col., 1989).

La información sobre la participación de la serotonina en los mecanismos que regulan la secreción de las gonadotropinas y la ovulación hasta el momento es contradictoria. Algunos autores indican que este sistema de neurotransmisión estimula la secreción de las gonadotropinas y la ovulación (Brown, 1966; Kordon y col., 1994; Vitale y Chiocchio, 1993; Wilson y col., 1986), mientras que otros señalan que ejerce un efecto inhibitorio (Kordon y col., 1968, 1994; O'steen, 1964, 1965; Parisi y col., 1983; Vitale y Chiocchio, 1993; Wilson y col., 1977). Sin embargo, se ha sugerido que la amina participa en tales procesos modulando los mecanismos centrales que culminan con la ovulación o regula directamente la actividad de la gónada (Kordon y Glowinski, 1972; O'steen, 1964, 1965; Wilson y McDonal, 1974; Wilson y col., 1977).

La administración sistémica del 5-hidroxitriptofano (precursor inmediato de la síntesis de serotonina) o de serotonina a ratas hembras prepúberes de dieciséis ó veinte días de edad incrementa la concentración de la LH en plasma. Cuando se realiza el mismo tratamiento a los 21 ó 26 días no se observan cambios en la concentración de LH en plasma y en los animales de 30

días sometidos al mismo tratamiento, disminuye la concentración de LH plasmática (Arias y col., 1990; Becú-Villalobos y Libertun, 1986; Moguilevsky y col., 1985; Justo y col., 1989). Sin embargo, cuando las ratas machos de las mismas edades son sometidas a los mismos tratamientos, la secreción de la LH no se modificó y se incrementó la de FSH. Estos resultados llevaron a los autores a sugerir que la participación del sistema serotoninérgico en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas es diferente durante el desarrollo prepuberal del animal y entre las hembras y machos (Justo y col., 1989; Moguilevsky y col., 1985).

La participación diferencial del sistema serotoninérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, posiblemente es un reflejo del medio ambiente esteroide en que se encuentra el animal cuando se realizan las manipulaciones de dicho sistema (Arias y col., 1990; Moguilevsky y col., 1985, 1990). Diversas evidencias experimentales han permitido sugerir que los estrógenos y la progesterona modulan la actividad del sistema serotoninérgico vía la regulación de la síntesis y liberación del neurotransmisor y expresión de los receptores a la amina en diversas estructuras del SNC (Alves y col., 1998, Beigon y col., 1980, 1982; Bethea, 1993, 1994; Penics y col., 1996, 1998; VanderHorst y col., 1998).

En la rata adulta, en el día del proestro y estro el porcentaje de unión de la serotonina marcada ($[^3\text{H}]$ 5-HT) administrada en el tercer ventrículo, disminuye a un 40 % en el cerebro anterior y es mayor en los otros días del ciclo. Estos hechos llevaron a los autores a sugerir que la disminución del porcentaje de unión es el resultado de la baja afinidad de los receptores al neurotransmisor o a un menor número de ellos (Beigon y col., 1980). Se sugiere que la síntesis y expresión de los receptores a los diferentes neurotransmisores están reguladas por las hormonas sexuales. Cuando se administra estradiol a ratas castradas, aumenta el porcentaje de unión de la serotonina en el área preóptica, hipotálamo anterior y núcleo arcuato-eminencia media. Estos resultados apoyan la idea de que los estrógenos modulan la expresión del receptor a la serotonina en el hipotálamo (Beigon y col., 1980, 1982).

En la rata hembra de dieciséis días de edad tratadas con estrógenos y progesterona la concentración de LH en plasma disminuye y este efecto de retroalimentación negativo se

acompaña de la disminución en las concentraciones de 5-HT y su metabolito el ácido 5-HIAA. En cambio, en el área preóptica de los animales de 30 días el efecto es inverso (Moguilevsky y col., 1990). En la rata adulta castrada la administración de estrógenos y progesterona resulta en el incremento de la concentración de LH en el plasma y de serotonina en el área preóptica, y disminuye la tasa de recambio de la amina en la eminencia media y el núcleo ventromedial (King y col., 1986; James y col., 1989). En conjunto estos resultados llevaron a pensar que durante la maduración sexual de la rata y en la etapa adulta, las hormonas ováricas ejercen un mecanismo de retroalimentación estimulante sobre la secreción de la LH al modificar la actividad del sistema serotoninérgico.

Kato (1960) mostró que en ratas hembras prepúberes y machos adultos la administración de estrógenos durante siete días, incrementa la concentración de serotonina en el cerebro. Sin embargo, cuando los animales son tratados con testosterona no se modifica dicho parámetro. Tales diferencias han permitido pensar que son los estrógenos los que regulan la actividad del sistema serotoninérgico. Por otra parte, la administración del 5-hidroxitriptofano a ratas hembras prepúberes castradas y androgenizadas disminuye la concentración plasmática de LH, mientras que en los machos castrados y tratados con 5-HTP la concentración de esta hormona se incrementa y disminuye la de FSH. Estas respuestas diferenciales entre la hembra y el macho son un reflejo de las acciones que las hormonas ováricas y testiculares ejercen en los centros hipotalámicos que regulan la secreción de las gonadotropinas (Justo y col., 1989; Moguilevsky y col., 1987).

Los resultados obtenidos en los diferentes modelos experimentales empleados para analizar la participación de los núcleos dorsal o del medial del rafé en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, han permitido sugerir que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en ellos participa de manera diferencial en los mecanismos de regulación de la secreción de las gonadotropinas y de la función del ovario en el animal adulto (Héry y col., 1978; Morello y Teleisnik, 1985).

En la rata adulta la lesión electrolítica del núcleo dorsal del rafé, disminuye la concentración de 5-HT en el área preóptica e hipotalámica anterior y en la eminencia media. Así

mismo, se observa degeneración de las fibras serotoninérgicas en la eminencia media. Tales evidencias apoyan la idea de que dichas áreas del SNC reciben inervación serotoninérgica que se origina principalmente en este núcleo (Van de Kar y Lorens, 1979; Villar y col., 1984).

En la rata hembra castrada con implante de estradiol, disminuye la secreción de la LH cuando se seccionan las fibras serotoninérgicas que se originan en el núcleo dorsal del rafe, mientras que cuando se seccionan las fibras provenientes del núcleo medial la concentración de la hormona no se modifica (Héry y col., 1978). En cambio, en la hembra castrada la lesión electrolítica del núcleo medial del rafe no modifica la liberación de la LH inducida por la administración de estrógenos y progesterona (Barofsky, 1975). Dichos resultados llevaron a sugerir que la inervación que proviene del núcleo medial no participa en los mecanismos que regulan la secreción de la LH y al parecer la integridad del núcleo dorsal es importante para que se produzca este evento (Barofsky, 1975; Héry y col., 1978). Por otra parte, Arendash y Gallo (1979) mostraron que en la rata hembra adulta castrada, la estimulación electroquímica del núcleo dorsal del rafe disminuye la secreción de la LH durante el tiempo en que dura la estimulación. Dichos resultados llevaron a pensar que la información serotoninérgica proveniente del núcleo dorsal del rafe inhibe la secreción de la LH. Estos resultados contradictorios se deben a que se utilizan modelos de estudio diferentes y no se considera el medio ambiente esteroide en que se encuentra el animal.

En el mono se han identificado receptores a progesterona y estrógenos en el núcleo dorsal del rafe (Bethea y col., 1993, 1994). En la rata hembra el número de neuronas del núcleo dorsal del rafe que expresan receptores a progesterona es mayor que la del macho, aunque no existe diferencia significativa en el número de receptores a estrógenos. La distribución de estos receptores en el núcleo dorsal del rafe no es homogénea, debido a que en la región lateral del núcleo existe un mayor número de células que expresan los receptores a estrógenos (Alves y col., 1998).

Hasta el momento en la rata no se han identificado neuronas serotoninérgicas que expresen receptores nucleares a estrógenos o progesterona. Únicamente se ha observado la presencia de

receptores en células adyacentes a dichas neuronas, lo que podría indicar que la regulación que ejercen los esteroides sobre la actividad del sistema serotoninérgico no es de forma directa sino por intermedio de una célula neural no aminérgica (Alves y col., 1998).

En la rata adulta en diestro la lesión del núcleo dorsal del rafé, modifica el ciclo estral e incrementa la secreción preovulatoria de la FSH y la LH 48 ó 72 horas después de la lesión, mientras que disminuye la concentración de serotonina en la eminencia media. En cambio, 45 días posteriores a la lesión la concentración plasmática de LH y PRL disminuye y la ovulación no se modifica en ambos grupos. Dichos resultados llevaron a los autores a sugerir que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal estimula la secreción de las gonadotropinas modulando el inicio y la magnitud del pico preovulatorio de las gonadotropinas (Vitale y col., 1987).

En la rata adulta en proestro, la estimulación eléctrica del núcleo medial del rafé, disminuye la concentración de la LH en plasma y bloquea la ovulación, mientras que cuando se estimula al núcleo dorsal no se observan cambios. En cambio, cuando se realiza la lesión del núcleo medial no se presentan modificaciones en dichos parámetros y si se realiza la misma intervención en el núcleo dorsal, se bloquea la ovulación y este evento se acompaña de la disminución de la concentración de la LH en plasma. Estos resultados permiten pensar que la inervación serotoninérgica que proviene del núcleo medial participa de manera inhibitoria en la regulación de la secreción preovulatoria de la LH y en la ovulación y la que se origina en el dorsal ejerce un efecto estimulante (Morello y Taleisnik, 1985, 1988).

El efecto estimulante que ejerce la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé sobre los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas, posiblemente es mediado por el sistema noradrenérgico, debido a que se ha mostrado que la administración de propanolol (agonista de los receptores adrenérgicos) a ratas adultas con lesión del núcleo dorsal, incrementa la concentración de LH en plasma y restablece la ovulación (Morello y Taleisnik, 1988). Mientras que el efecto inhibitorio que ejerce el núcleo medial en tales eventos es mediado por el sistema GABAérgico, ya que se ha observado que el

tratamiento con bicuculina (antagonista de los receptores del tipo GABA A) a animales con estimulación del núcleo medial, incrementa la concentración de LH en plasma y restablece la ovulación (Morello y col., 1989).

En la rata hembra prepúber, la lesión del núcleo dorsal o medial del raqué provocada por la administración de 5,7-hidroxitriptamina, bloquea la ovulación inducida por la PMSG y disminuye la recaptura de la serotonina en la eminencia media y en el núcleo dorsal. Estos resultados permiten pensar que los núcleos dorsal y medial del raqué regulan de manera estimulante la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, y que al parecer el núcleo dorsal es el más importante para que se manifiesten dichos eventos (Meyer, 1978).

La lesión térmica del núcleo dorsal del raqué en la rata de 21 días retrasa las edades de la apertura y del primer estro vaginal, y no se presentan cambios en estos parámetros cuando la destrucción de dicho núcleo se realiza a los 24, 27 ó 30 días de edad. Además, la proporción de animales que ovulan al primer estro vaginal, no se modifica por la lesión realizada a los 21, 24 ó 27 días de edad; sin embargo el número de ovocitos liberados se incrementa cuando la lesión del núcleo se efectúa en el día 24 y 27. En cambio, ninguno de los animales lesionados en el día 30 ovulan al primer estro y la administración de hCG únicamente restaura la ovulación en el 60 % de ellos. Estos resultados llevaron a los autores a plantear que la inervación serotoninérgica que se originan en el núcleo dorsal del raqué participa de manera diferencial durante el desarrollo prepuberal de la rata, en los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación (Ayala y col., 1994, 1998).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La secreción de las gonadotropinas y la ovulación son reguladas por señales neuroendócrinas generadas en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, éstas a su vez están moduladas por estructuras extrahipotálamicas como los núcleos dorsal y medial del rafe. Se sugiere que en el animal adulto la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe, participa de manera estimulante en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la información serotoninérgica que proviene del rafe medial ejerce un efecto inhibitorio. Sin embargo, hasta el momento se le ha dado poca importancia a la participación de estos núcleos en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-gónada durante el desarrollo prepuberal del animal que culminan con el inicio de la pubertad y la primera ovulación.

Dado que en la rata de 30 días de edad (prepúber) la lesión térmica del núcleo dorsal del rafe bloqueó la ovulación en el día del primer estro vaginal e incrementó la incidencia de atresia en los folículos preovulatorios, lo que llevó a los autores a sugerir que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal está vinculada a modificaciones en la secreción de las gonadotropinas. Sin embargo, se desconoce si los cambios en la ovulación son el resultado de la eliminación de los somas serotoninérgicos o también de los dopaminérgicos que se ubican en la región ventral del mismo, por lo que la lesión térmica no es específica para las neuronas serotoninérgicas (Ayala y col., 1998). Por ello en el presente estudio se analizó la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo anterior, medio y posterior que se origina en los núcleos dorsal y medial del rafe sobre los mecanismos que regulan la pubertad y la primera ovulación, por medio del análisis de los efectos de la lesión química de los núcleos dorsal o medial del rafe inducida por la administración de 5,6-DHT (neuróxico de las fibras serotoninérgicas) en la etapa juvenil (30 días de edad) de la rata.

HIPÓTESIS

Dado que en el animal adulto la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafe y que inerva el hipotálamo anterior y medio, regula de manera estimulante la secreción de la GnRH y las gonadotropinas, mientras que la que proviene del núcleo medial es de tipo inhibitorio, la lesión selectiva de estos núcleos, provocará modificaciones diferenciales en el inicio de la pubertad y en la primera ovulación, las cuales dependerán del núcleo que sea eliminado.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación del sistema serotoninérgico del hipotálamo anterior, medio y posterior que se origina en los núcleos dorsal o medial del raquí en los mecanismos que modulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Estudiar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del raquí, sobre las edades de la apertura y primer estro vaginal y la primera ovulación en la rata prepúber.

Analizar los efectos de la lesión del núcleo dorsal del raquí, sobre el crecimiento y diferenciación del fólculo ovárico.

Analizar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del raquí, sobre las concentraciones de la hormona luteinizante, de la progesterona y del 17β -estradiol en el suero.

Analizar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del raquí, sobre la actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo anterior, medio y posterior.

MATERIALES Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembras de 30 días de edad, de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de iluminación, 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días) y posteriormente al agua y al alimento hasta el sacrificio. A todos los animales de los diferentes grupos experimentales se les registró el día de la apertura vaginal, momento en el cual se inició la toma de frotis vaginales diarios, que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eosina. Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del día del primer estro vaginal.

Procedimiento de lesión

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (anestésico, Smit Kline Norden de México, México) (40 mg/kg peso) por vía intraperitoneal (i.p.) seguido de anestesia complementaria con éter; fueron montados en un aparato estereotáxico, se seccionó la piel, se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo una aguja de 22x13 mm (conectada a una jeringa Hamilton de 100 µl, acoplada a una bomba de microdiálisis (MCA/100 Bionalytical Systems, USA). Las coordenadas para introducir la aguja de microinyección hasta el sitio de estudio, se calcularon tomando como referencia el atlas del cerebro del animal prepúber de Sherwood y Timiras (1970). Las coordenadas consideradas para el núcleo dorsal del rafe fueron: anteroposterior (AP) 0.7 mm, lateral (L) 3.3 mm con una inclinación de 30° perpendicular a la línea media y ventral (V) 6.4 mm y para el núcleo medial del rafe fueron: AP=0.5 mm, L=4.9 mm con una inclinación de 35° a la línea media y V=8.0 mm. Para realizar la lesión de los núcleos, se inyectaron 10 µg de 5,6-DHT (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) en un volumen de 2.5 µl de ácido ascórbico al 0.05 % (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) (pH=3.5) (Figura 6). Como grupos de comparación se utilizaron animales que recibieron 2.5 µl de solución salina al 0.9 % (operación simulada con salina) ó 2.5 µl de ácido ascórbico al 0.05 % (operación simulada con ácido ascórbico). Como grupo testigo absoluto se utilizaron ratas prepúberes sin tratamiento sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

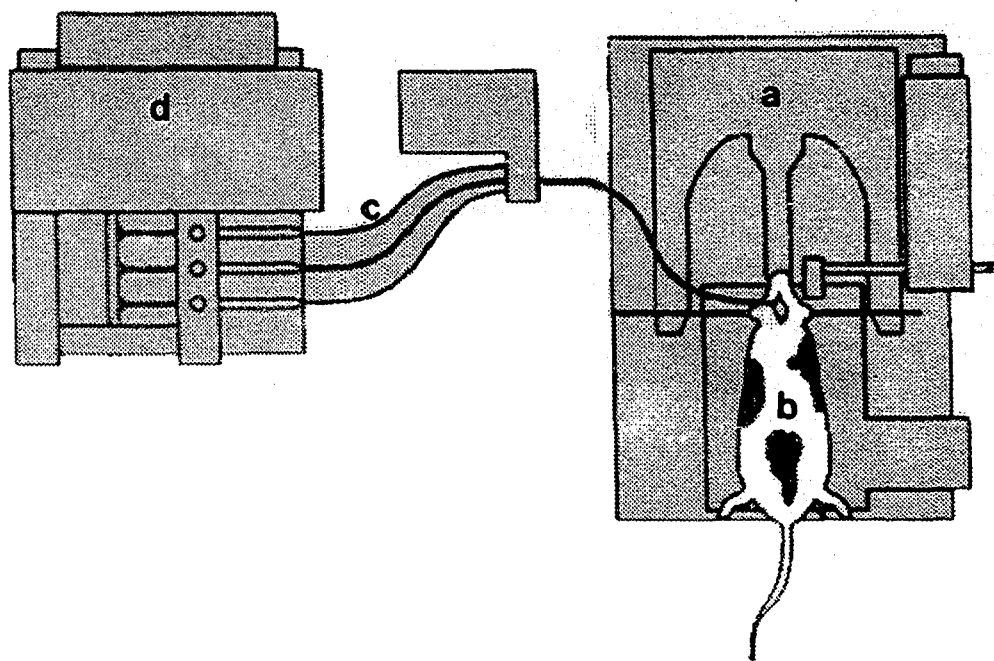


Figura 6. Representación esquemática del procedimiento de microinyección: a) aparato estereotáxico, b) animal de estudio (rata hembra), c) sistema de microinyección y d) bomba de microinyección (MCA/100).

Procedimiento de autopsia

Los animales fueron pesados e inmediatamente sacrificados por decapitación entre las 8.00 y 11.00 a.m. A la autopsia se disecaron y pesaron en balanza de precisión los ovarios y el útero. Las trompas uterinas se revisaron y se contó el número de ovocitos liberados, cuando estuvieron presentes, con la ayuda del microscopio estereoscópico. El peso de los órganos fue expresado en miligramos (mg). Se colectó la sangre del tronco y se dejó coagular por 30 minutos, posteriormente se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm y se separó el suero, el cual se almacenó a -20°C hasta la cuantificación de progesterona, 17β-estradiol y LH.

Se extrajo el cerebro, el cual se colocó en solución salina fría (0°C) y se congeló con nitrógeno líquido. Se efectuaron cortes coronales para la separación del hipotálamo anterior, medio y posterior tomando como referencia el atlas de Paxinos y Watson (1982) (apéndice A). Las muestras se almacenaron a -70°C hasta la posterior cuantificación de noradrenalina, dopamina, serotonina y de sus principales metabolitos [ácido 4, hidroxil-3-metoxifeniletenglicol (MHPG), el ácido 3,4-dihidroxifenil acético (DOPAC) y el ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA)] por cromatografía de líquidos de alta precisión (apéndice B).

Análisis del sitio de lesión

Para localizar de la trayectoria de la aguja en los animales con solución salina, con ácido ascórbico o del sitio de lesión inducido por la microinyección de la 5,6-DHT, el cerebro de los animales se fijó en formol al 10 % durante 24 h y posteriormente se realizaron cortes coronales (de la región frontal a la caudal) de 120 μm de grosor en el criostato, los que se tiñeron con violeta de cresilo (Luna, 1975).

Estudio de la población folicular

El análisis de la población folicular se realizó en los ovarios 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 tiñeron con hematoxilina-eosina. Se revisaron todos los cortes y con la ayuda de un ocular micrométrico se midió el diámetro mayor (D₁) y el perpendicular a este (D₂) en

los folículos que presentaron núcleo y nucleólo bien definido (Figura 7). Con el valor de los diámetros obtenidos de cada folículo se calculó el diámetro promedio y se clasificaron por tamaño según los parámetros propuestos por Hirshfield (1978) en las siguientes categorías:

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

Además de considerar el tamaño de los folículos, también se consideró el estado de los mismos. Los folículos fueron considerados atrésicos cuando presentaron alguna de las siguientes características: picnosis de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa en el antro folicular, engrosamiento de la teca y alteración del ovocito (Greenwald y Roy, 1994). El diámetro promedio se calculó con la relación: $\text{Diámetro promedio} = (D_1 + D_2) / 2$

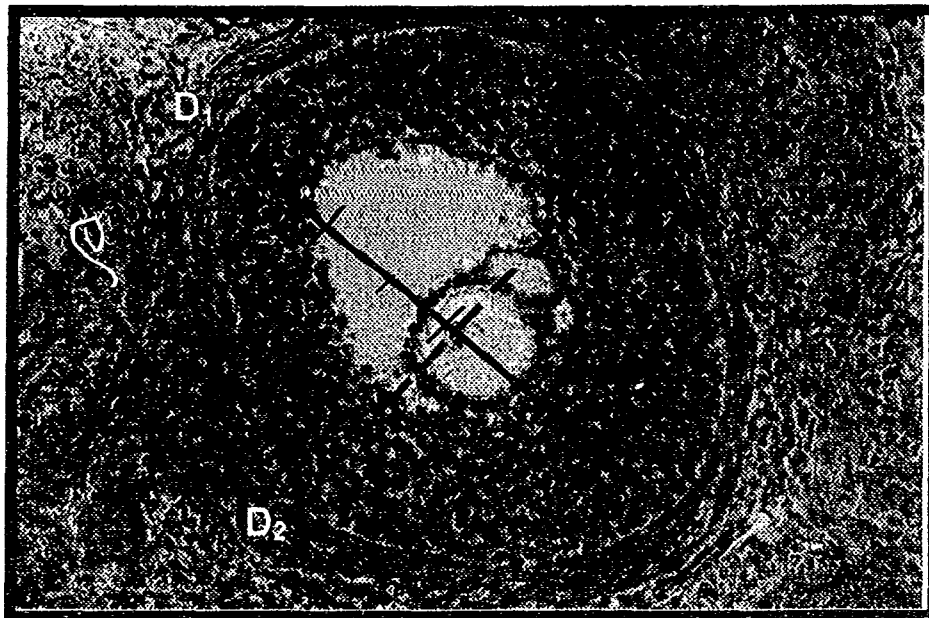


Figura 13. Representación esquemática de la medición de los diámetros foliculares: diámetro mayor (D_1) y diámetro perpendicular (D_2) (40 x).

Cuantificación de hormonas esteroides

La cuantificación de progesterona y 17 β -estradiol se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis de fase sólida, con un kit Coat-A-Count. La concentración de progesterona fue expresada en nanogramos por mililitro (ng/ml) y la de 17 β -estradiol en picogramos por mililitro (pg/ml) (apéndice C).

Cuantificación de la LH

La cuantificación de la LH se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis (Garza y col., 1996; Salve y col., 1994; Tovar y col., 1984) empleando anticuerpos rLH-¹²⁵I-RP2. La concentración de la hormona fue expresada en ng/ml de suero (apéndice C).

Cuantificación de neurotransmisores y sus metabolitos

La concentración de noradrenalina, dopamina, serotonina y sus metabolitos se realizó siguiendo la metodología descrita por Ayala y col. (1998). Las muestras se pesaron y homogeneizaron en ácido perclórico 0.1N, se centrifugaron a 12,000 g a -4°C por 30 minutos, el sobrenadante se filtró a través de una malla de celulosa de 0.2 μ m de poro y se inyectó veinte microlitros del extracto en el sistema de cromatografía de líquidos (apéndice B).

La concentración del neurotransmisor y su metabolito fue expresado en nanogramos por miligramo de tejido (ng/mg de tejido). La actividad de la neurona serotoninérgica se calculó con la relación descrita por Kerdelhué y col., (1989) y Shannon y col., (1986).

$$\text{Actividad de la neurona} = \frac{[\text{Metabolito}]}{[\text{Neurotransmisor}]}$$

Análisis estadístico

Los resultados del peso corporal, los ovarios y del útero, la concentración de noradrenalina, dopamina, serotonina, sus metabolitos y la relación [5-HIAA]/[5-HT] fueron analizados por la prueba análisis de varianza múltiple (ANDEVA) de seguida de la prueba de Tukey. Las edades de la apertura vaginal y del primer estro vaginal, el número de ovocitos y el

número de folículos por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de “U” de Mann-Whitney. La tasa de animales ovulantes (TAO) fue evaluada por la prueba de Ji-Cuadrada. En todos los casos se consideraron como significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue igual o menor al 5 %.

$$\text{TAO} = \frac{\text{Número de animales ovulantes}}{\text{Número total de animales tratados}} \times 100$$

1.- Caracterización del desarrollo peripuberal de la rata

En los días próximos al inicio de la pubertad se desencadena la cascada de mecanismos neuroendócrinos que culminan con la secreción preovulatoria de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación, que posiblemente están asociados a modificaciones en la actividad de los diferentes sistemas de neurotransmisión como el serotoninérgico. Por ello, este experimento fue diseñado para analizar los cambios que se producen en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario durante la etapa peripuberal de la rata hembra y que están vinculados con el inicio de la pubertad y la primera ovulación. Para lo cual se evaluaron los siguiente parámetros: el peso de los ovarios y del útero, las concentraciones en el suero de hormonas ováricas (progesterona y 17β -estradiol) y las concentraciones de serotonina, su metabolito y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior, medio y posterior así como en los núcleos dorsal y medial del rafe.

Para ello, ratas de 30, 32, 35 y 38 días de edad fueron sacrificadas entre las 8:00 y las 11:00 a.m. Otro grupo de animales se sacrificó en el día en que se presentó el primer estro vaginal.

Resultados

Peso de los órganos

El peso corporal, de los ovarios y del útero de los animales sacrificados a diferentes edades se incrementó con la edad (Tabla 1). El máximo peso corporal se observó en el día del primer estro vaginal.

Tabla 1. Media \pm e.e.m. del peso corporal, de los ovarios y del útero de ratas sacrificadas a partir del día 30 de edad y hasta el día del primer estro vaginal (PEV).

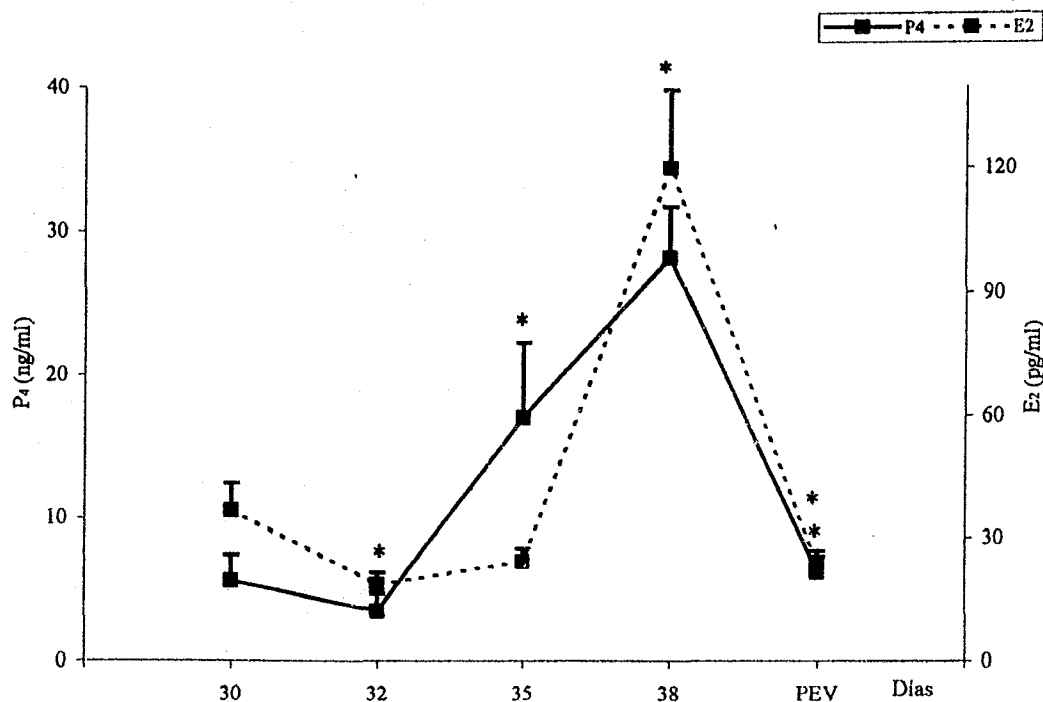
Grupo	n	Peso Corporal (g)	Ovarios (mg)	Útero (mg)
30 Días	11	76.3 \pm 2.2	23.7 \pm 1.4	55.5 \pm 3.7
32 Días	11	80.6 \pm 3.5	25.8 \pm 1.5	74.9 \pm 8.6
35 Días	11	95.7 \pm 2.0	26.9 \pm 2.0	87.9 \pm 10
38 Días	9	93.8 \pm 2.0	27.4 \pm 2.1	138.3 \pm 20.7
PEV	47	120.7 \pm 2.2 *	33.7 \pm 1.3	168.3 \pm 4.5

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

La canalización de la vagina se presentó alrededor del día 41.1 ± 0.5 de edad, momento en el cual el 64 % de los animales presentaron escamas en el frotis vaginal (característica de estro), el 17 % células nucleadas (característico de proestro) y en el 19 % restantes se observaron leucocitos (características de diestro). Los animales que al abrir vagina el frotis vaginal fue de proestro presentaron el primer estro vaginal alrededor del día 45.5 ± 1.5 y los de diestro aproximadamente en el día 44.2 ± 0.8 de edad. Todos los animales fueron sacrificados en el día del primer estro vaginal y el 79 % de ellos ovularon en promedio 8.9 ± 0.5 ovocitos por animal ovulante.

Concentración de progesterona y estrógenos en el suero

La concentración de progesterona en el suero fue similar entre el día 30 y 32 de edad, incrementó entre los 35 y 38 días, mientras que en el día del primer estro vaginal fue menor que en las edades anteriores. La concentración de 17β -estradiol se mantuvo baja de los 30 a 35 días de edad y en el día 38 incrementó de manera significativa para disminuir en el día del primer estro vaginal (Figura 8).



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

Figura 8. Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona (P_4) y 17β -estradiol (E_2) en el suero de ratas testigo absoluto sacrificadas a partir del día 30 de edad y hasta el día del primer estro vaginal (PEV).

En el hipotálamo anterior y medio no se observaron diferencias significativas en la concentración de serotonina. La concentración del 5-HIAA fue alta a los 30 y 32 días y disminuyó a partir de los 35 días de vida. En ambas regiones la actividad de la neurona serotoninérgica fue menor a partir del día 35 y se mantuvo baja hasta el día del primer estro vaginal (Figuras 9 y 10). No se observaron cambios significativos en dichos parámetros en el hipotálamo posterior (Figura 11).

En el núcleo dorsal del rafé la concentración de serotonina no se modificó en ninguna de las edades estudiadas, mientras que la del 5-HIAA disminuyó en el día 35 y la actividad de la

neurona serotoninérgica en el día 38 (Figura 12). En cambio, en el núcleo medial del raquí la serotonina incrementó en el día 32 y tres días después disminuyó, para volver a aumentar en el día 38. La concentración de su metabolito fue menor a los 35 días de vida y la mayor actividad de este sistema de neurotransmisión se observó a los 32 días y en el día del primer estro vaginal (Figura 13).

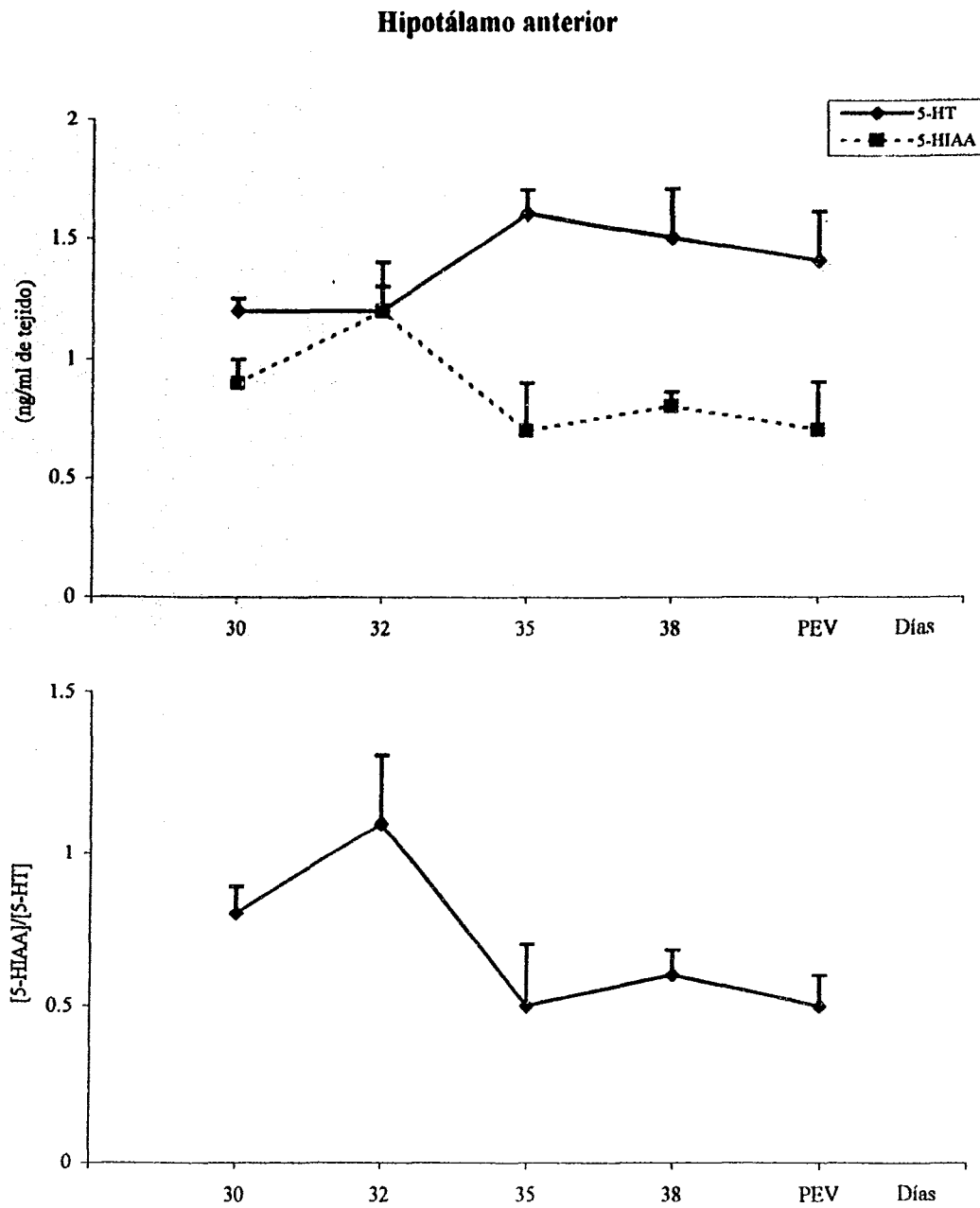
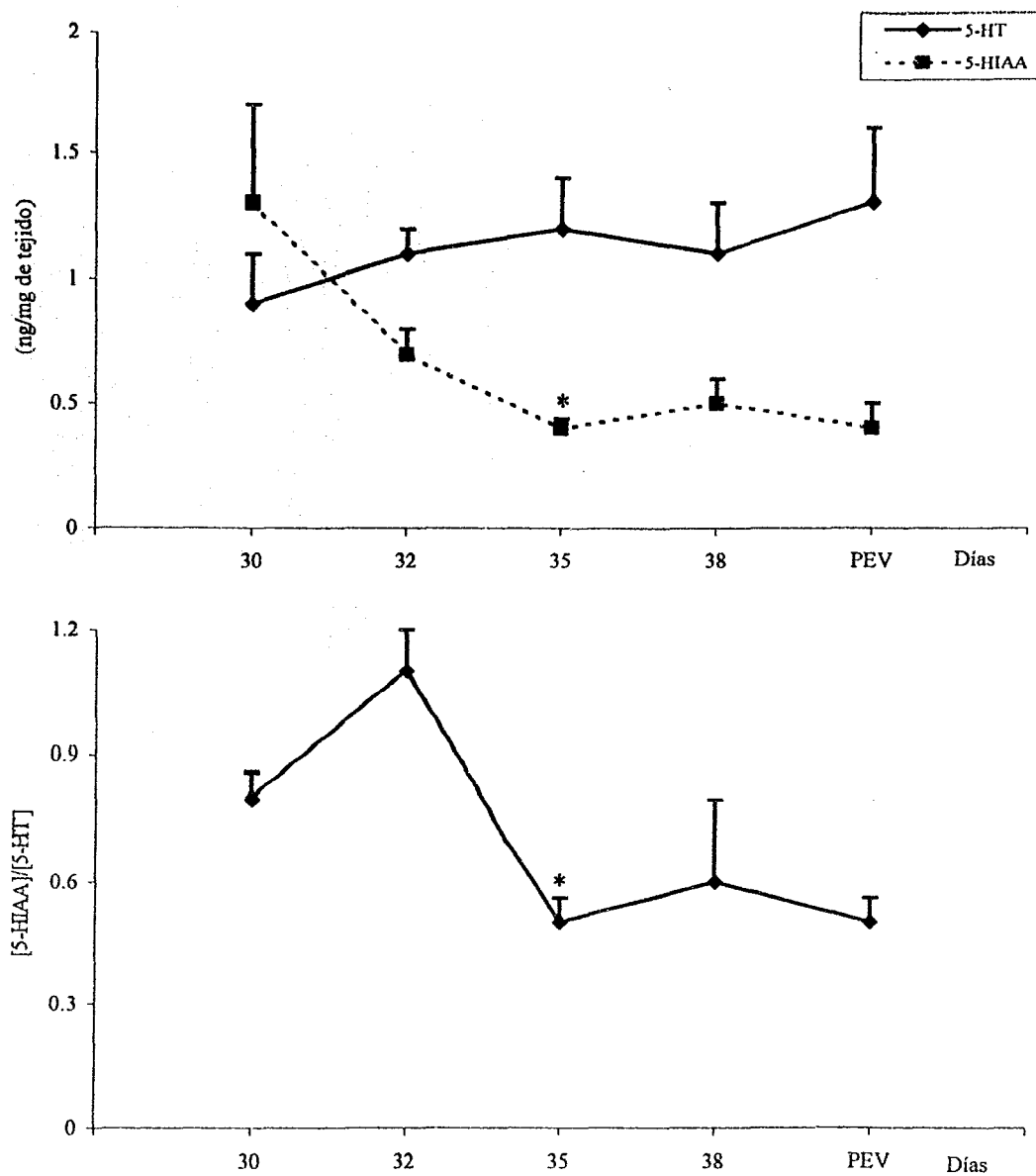


Figura 9. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior de ratas testigo absoluto sacrificadas a partir del día 30 de edad y hasta el día del primer estro vaginal (PEV).

Hipotálamo medio



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

Figura 10. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo medio de ratas testigo absoluto sacrificadas a partir del día 30 de edad y hasta el día del primer estro vaginal (PEV).

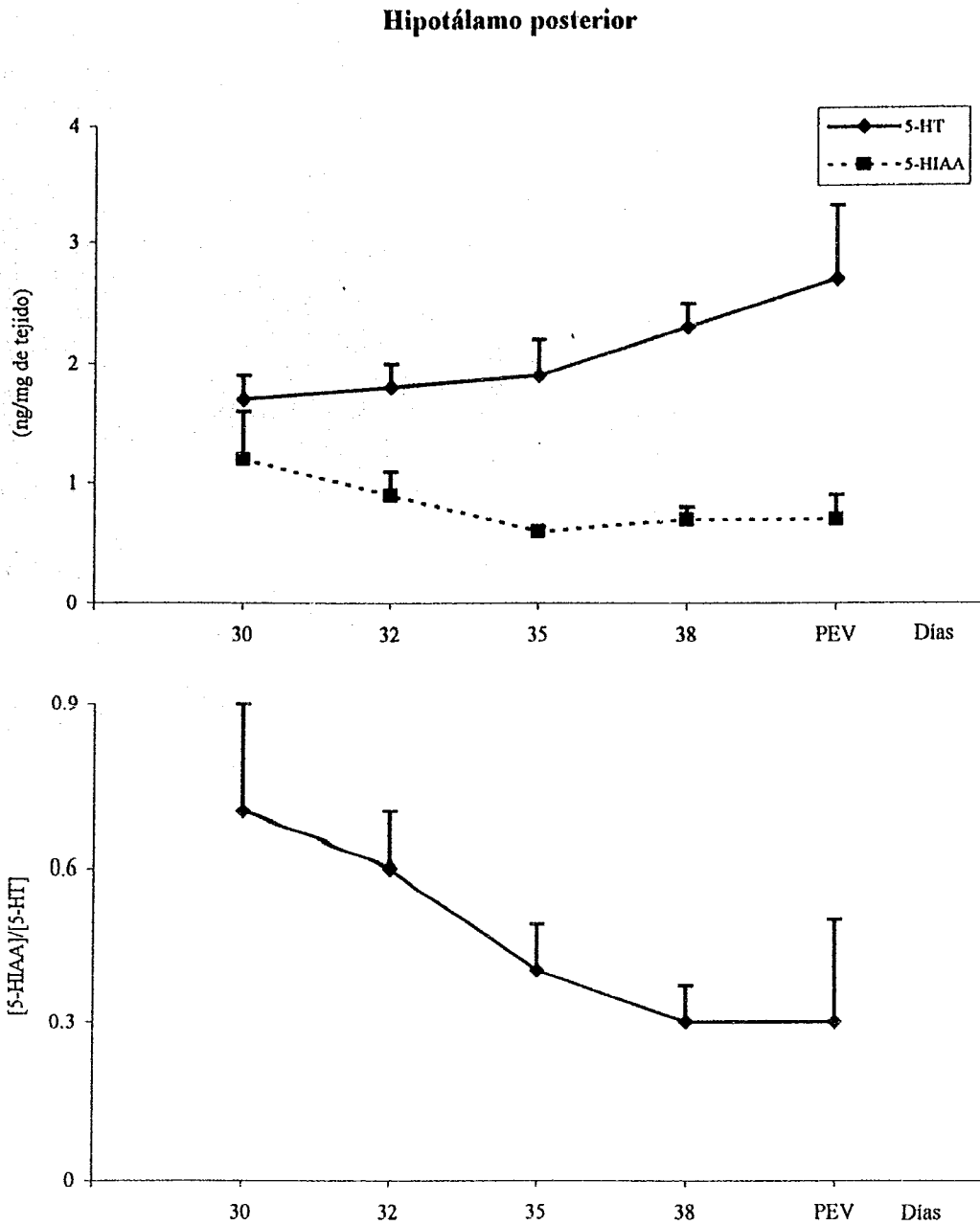
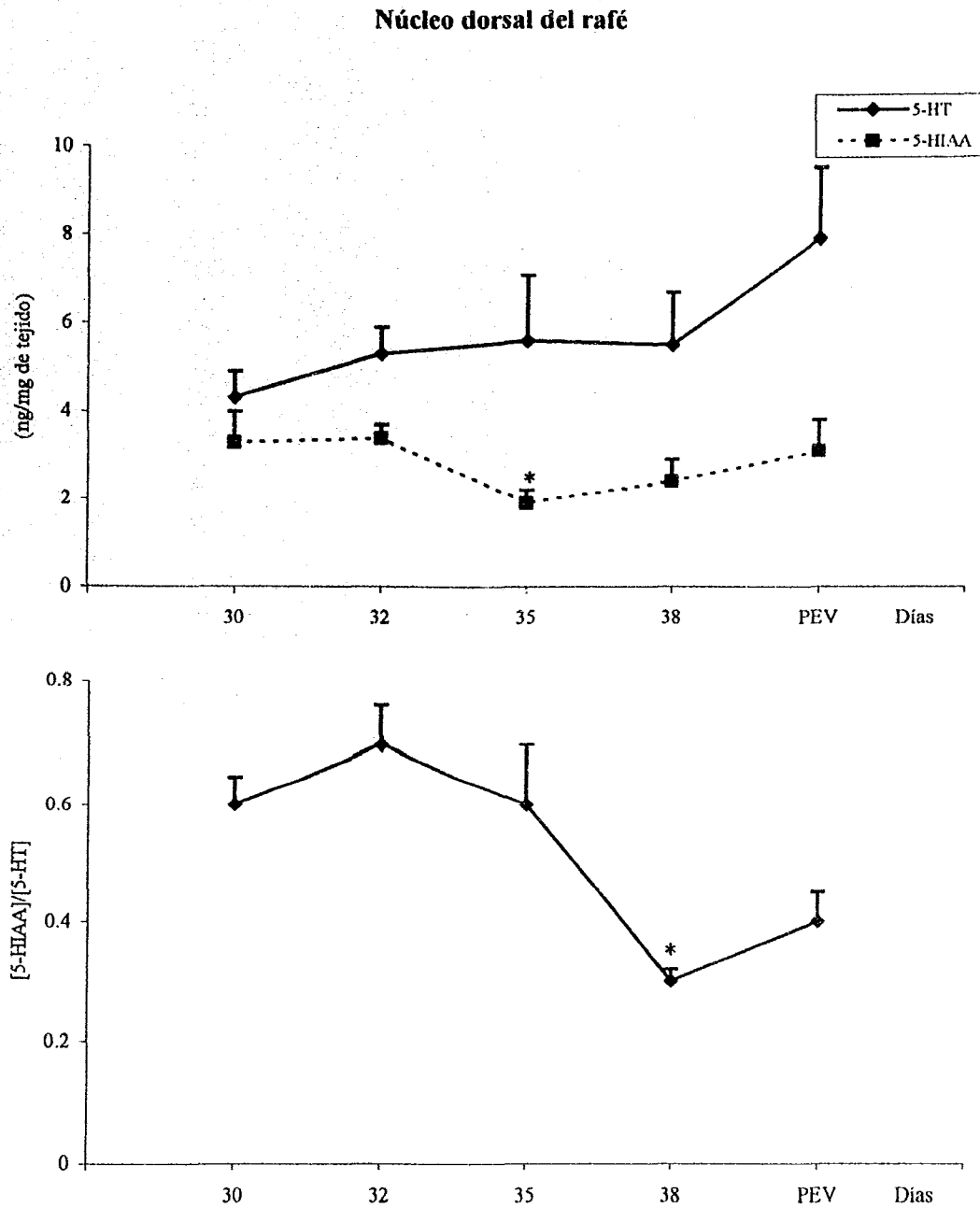


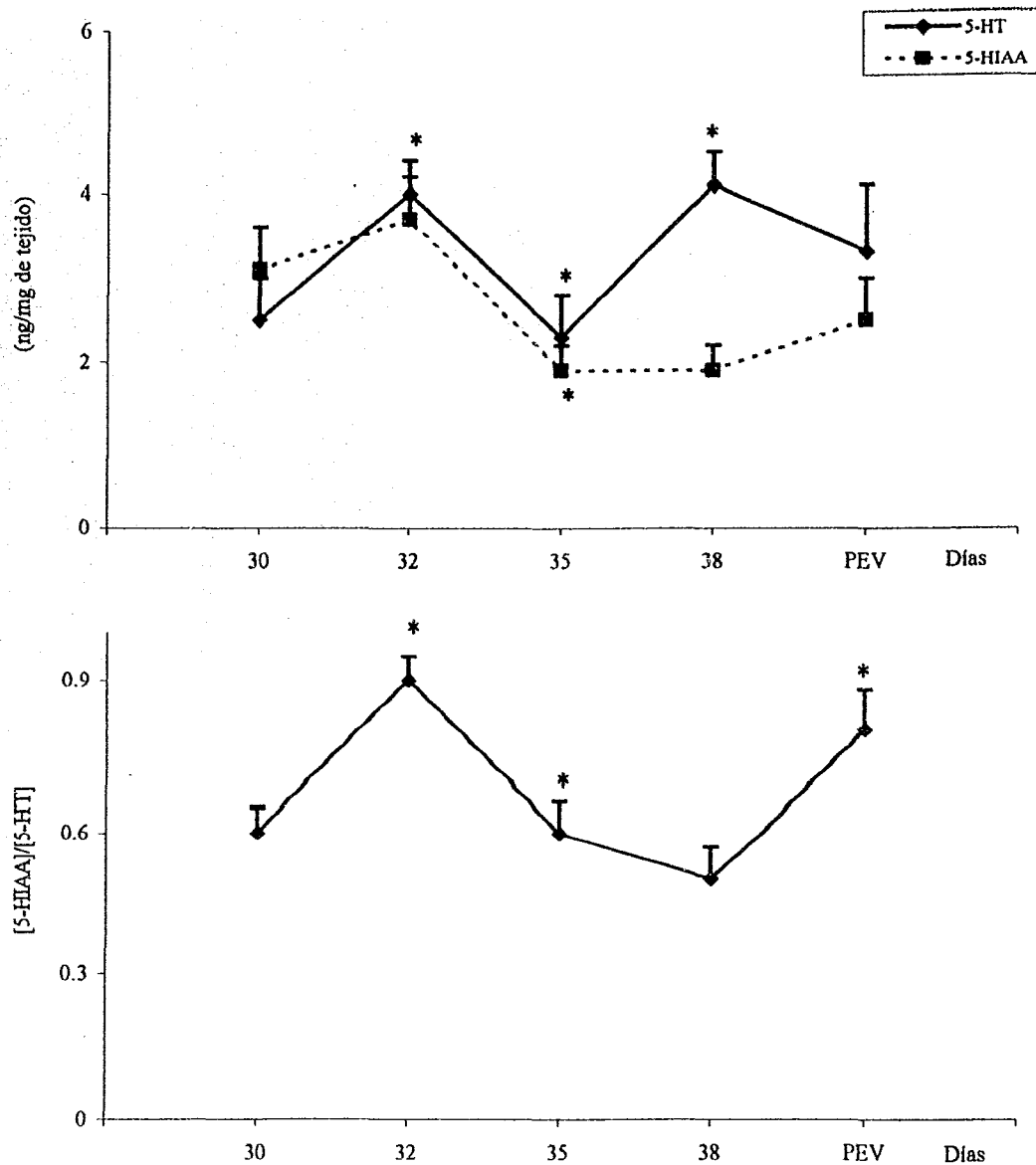
Figura 11. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo posterior de ratas testigo absoluto sacrificadas a partir del día 30 de edad y hasta el día del primer estro vaginal (PEV).



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

Figura 12. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el núcleo dorsal del raquí de ratas testigo absoluto sacrificadas a partir del día 30 de edad y hasta el día del primer estro vaginal (PEV).

Núcleo medial del raqué



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

Figura 13. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el núcleo medial del raqué de ratas testigo absoluto sacrificadas a partir del día 30 de edad y hasta el día del primer estro vaginal.

Los resultados obtenidos muestran que existen variaciones en la concentración de serotonina y la actividad del sistema serotoninérgico durante la etapa peripuberal de la rata hembra. La disminución en la concentración del 5-HIAA y el aumento en la concentración de serotonina en el hipotálamo anterior y medio observada en los días previos a la canalización vaginal (pubertad, entre el día 35 y 38 de edad), posiblemente indica una menor actividad de este sistema de neurotransmisión. Por ello, estos cambios en el sistema serotoninérgico podrían estar vinculados con la regulación de la secreción preovulatoria de la GnRH, de las gonadotropinas y la maduración final del folículo ovárico que culmina con la ovulación. Sin embargo, hasta el momento no se ha establecido la participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en los núcleos dorsal y medial del rafe, en los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación.

2. Estudiar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del rafe, sobre las edades de la apertura y primer estro vaginal y la primer ovulación en la rata prepúber.

Dado que se sabe que la fuente principal de la serotonina del hipotálamo se origina en los núcleos dorsal y medial del rafe, se decidió analizar los efectos de la manipulación química de dichos núcleos en la etapa juvenil de la rata (30 días de edad), sobre la pubertad espontánea y la primera ovulación.

En los grupos de animales con operación simulada (inyección de solución salina o de ácido ascórbico en el núcleo dorsal del rafe) se observó el retraso en las edades de la apertura vaginal y del primer estro vaginal. No se observaron diferencias significativas en la tasa de animales ovulantes y en el número de ovocitos liberados por animal ovulante. El peso del útero fue mayor en los animales que se les administró solución salina en el núcleo dorsal del rafe y no se observaron diferencias significativas en el peso corporal y de los ovarios (Tabla 2).

Tabla 2. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. de las edades de la apertura vaginal (EAV), del primer estro (EPE), del número de ovocitos liberados, del peso corporal (PC), de los ovarios y del útero de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo dorsal del raquí y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	TA	Salina	Ácido ascórbico
No. de animales	47	12	18
EAV	41.1 \pm 0.5	44.0 \pm 0.6 *	43.4 \pm 0.8 *
EPE	42.0 \pm 0.5	44.8 \pm 0.6 *	44.3 \pm 0.7 *
TAO	37/47	9/12	16/18
No. de Ovocitos	8.9 \pm 0.4	8.7 \pm 0.6	8.9 \pm 0.7
PC (g)	120.7 \pm 2.2	122.2 \pm 2.6	126.0 \pm 1.5
Ovarios (mg)	33.7 \pm 1.3	38.7 \pm 2.1	36.9 \pm 0.2
Útero (mg)	168.3 \pm 4.5	209.9 \pm 18.2 *	186.2 \pm 6.4

* $p < 0.05$ vs TA (Kruskal-Wallis seguido de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

Debido a que en los animales con operación simulada (inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo dorsal del raquí) se observaron diferencias significativas en las edades de la apertura y del primer estro vaginal en relación al grupo testigo absoluto, los efectos producidos por la microinyección de 5,6-DHT en el núcleo dorsal del raquí se compararon con los resultados obtenidos de los animales con inyección de ácido ascórbico.

El análisis de la identificación del sitio de inducido por la microinyección de la 5,6-DHT, mostró que en algunos animales la lesión comprendía únicamente la región lateral del núcleo dorsal (lesión lateral), en otros la región central del núcleo (lesión central) y en otros la lesión comprendía la totalidad del núcleo (lesión completa) (Figuras 14, 15 y 16). Por ello, los animales con lesión del núcleo dorsal se dividieron en tres grupos.



Figura 14. Corte coronal del cerebro de la rata, en el que se representa esquemáticamente la lesión lateral del núcleo dorsal del raquí. El área sombreada representa la lesión producida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del raquí. SGP (Sustancia gris periacueductal); FLM (Fascículo longitudinal medial); NDR (Núcleo dorsal del raquí) (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

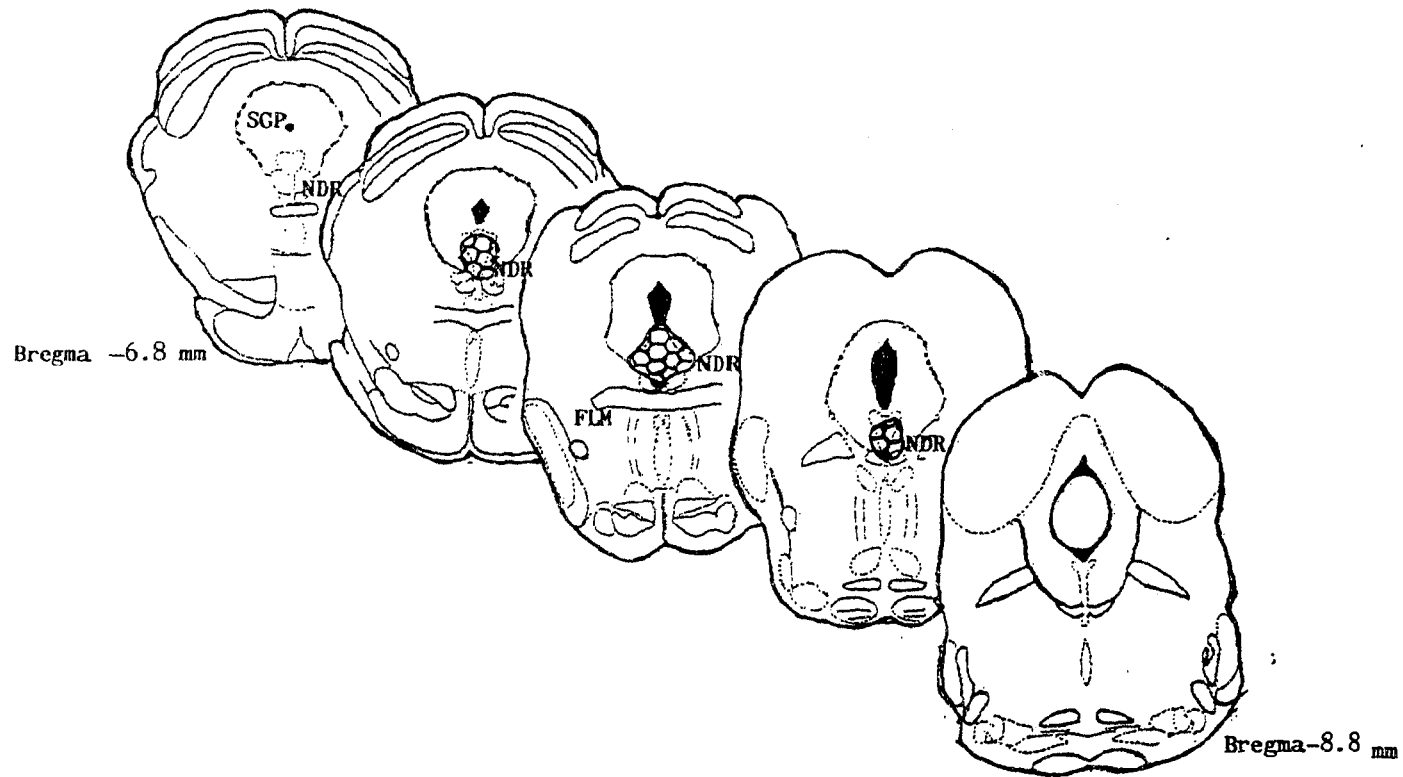


Figura 15. Corte coronal del cerebro de la rata, en el que se representa esquemáticamente la lesión central del núcleo dorsal del raquí. El área sombreada representa la lesión producida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del raquí. SGP (Sustancia gris periacueductal); FLM (Fascículo longitudinal medial); NDR (Núcleo dorsal del raquí) (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

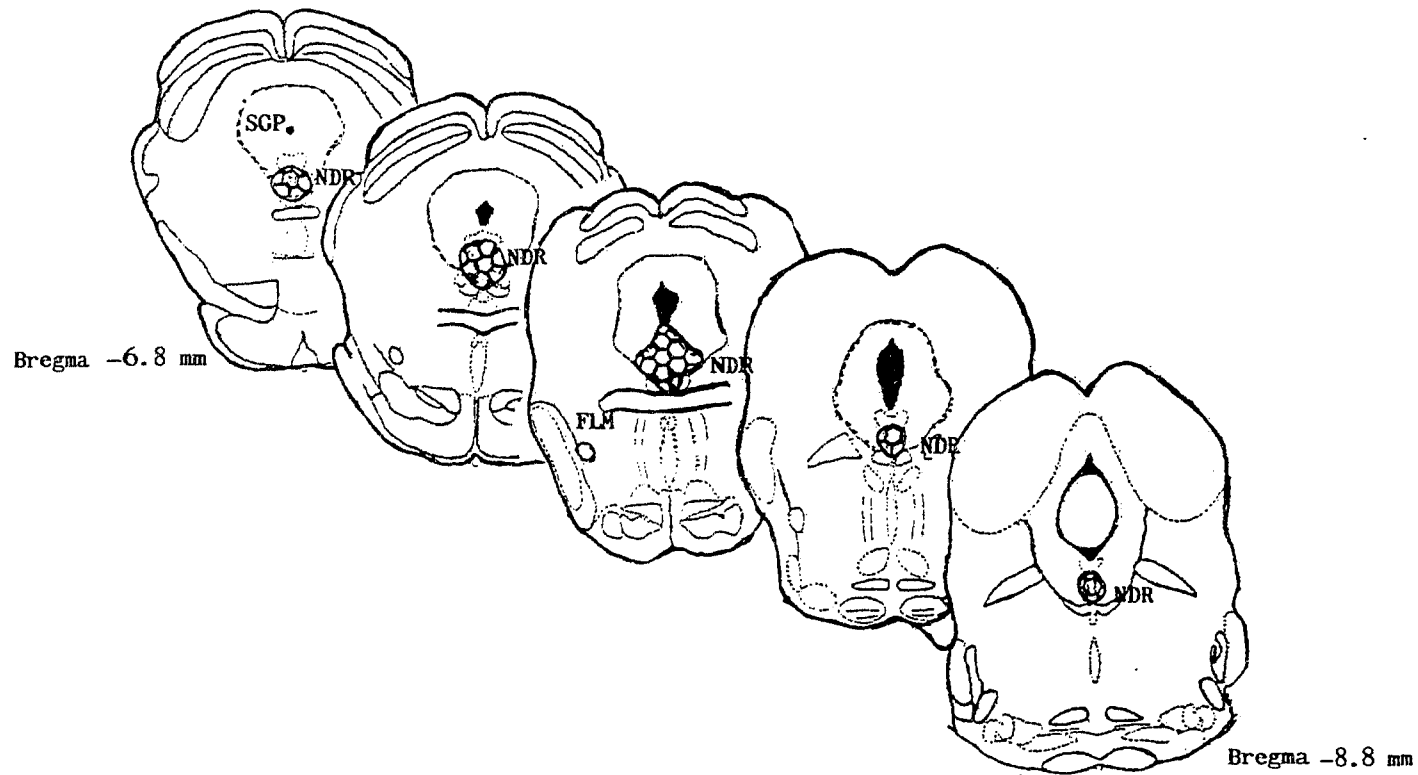


Figura 16. Corte coronal del cerebro de la rata, en el que se representa esquemáticamente la lesión completa del núcleo dorsal del raquí. El área sombreada representa la lesión producida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del raquí. SGP (Sustancia gris periacueductal); FLM (Fascículo longitudinal medial); NDR (Núcleo dorsal del raquí) (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

En comparación al grupo con operación simulada (inyección de ácido ascórbico), en los animales con lesión parcial (lateral o central) o completa del núcleo dorsal del raquí no se observaron modificaciones en las edades de la canalización de la vagina y del primer estro vaginal, y en la proporción de animales ovulantes. En cambio, en el grupo con lesión completa, ninguno de los animales ovuló en el día del primer estro vaginal, y en aquellos en los que se lesionó la región central del núcleo, el número de ovocitos liberados fue significativamente menor (Tabla 3).

El peso corporal de los animales en los que se lesionó la parte lateral, central o completa del núcleo fue similar al grupo que se le administró ácido ascórbico. El peso de los ovarios disminuyó en los animales con lesión completa en relación al grupo con lesión lateral, mientras que el peso del útero de los animales con lesión completa fue significativamente mayor que el de los animales con lesión lateral o central y fue similar al grupo con operación simulada (Tabla 3).

Tabla 3. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. de las edades de la apertura vaginal (EAV), del primer estro (EPE), del número de ovocitos liberados, peso corporal (PC), de los ovarios y del útero de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión lateral, central o completa del núcleo dorsal del raquí inducida por la inyección de (5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	Ácido ascórbico	Lesión lateral	Lesión central	Lesión completa
No. de animales	18	13	15	11
EAV	43.4 \pm 0.8	42.5 \pm 0.9	42.8 \pm 0.9	44.1 \pm 1.1
EPE	44.3 \pm 0.7	44.2 \pm 1.1	43.1 \pm 0.8	46.0 \pm 1.5
TAO	16/18	13/13	15/15	0/11
No. de Ovocitos	8.9 \pm 0.7	10.4 \pm 0.4	6.4 \pm 0.6 * \diamond	---
PC (g)	126.0 \pm 1.5	125.1 \pm 2.8	116.6 \pm 2.5	127.5 \pm 5.4
Ovarios (mg)	36.9 \pm 1.5	42.0 \pm 2.4	35.1 \pm 1.7	32.8 \pm 2.8 †
Útero (mg)	186.2 \pm 6.4	171.4 \pm 4.9	177.9 \pm 7.0	206.3 \pm 11.6 † \neq

* $p < 0.05$ vs con inyección de Ácido ascórbico (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

\diamond $p < 0.05$ vs. con Lesión lateral (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

† $p < 0.05$ vs. con Lesión lateral (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

\neq $p < 0.05$ vs. con Lesión central (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

En comparación con el testigo absoluto la inyección de solución salina o de ácido ascórbico en el núcleo medial del raqué no modificó de manera significativas las edades de la apertura vaginal, del primer estro, la proporción de animales ovulantes, el número de ovocitos liberados, el peso corporal y de los ovarios. El peso del útero fue mayor en los animales tratados con solución salina que en el grupo testigo absoluto (Tabla 4).

Tabla 4. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media \pm e.e.m. de las edades de la apertura vaginal (EAV), del primer estro (EPE), del número de ovocitos liberados, del peso corporal (PC), de los ovarios y del útero de ratas testigo absoluto (TA) o inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo medial del raqué y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	TA	Salina	Ácido ascórbico
No. de animales	47	12	14
EAV	41.1 \pm 0.5	42.6 \pm 0.5	41.9 \pm 0.6
EPE	42.0 \pm 0.5	43.8 \pm 0.6	42.9 \pm 0.6
TAO	37/47	9/12	10/14
No. de Ovocitos	8.9 \pm 0.4	7.9 \pm 0.5	9.3 \pm 0.7
PC (g)	120.7 \pm 2.2	117.8 \pm 1.8	123.5 \pm 2.6
Ovarios (mg)	33.7 \pm 1.3	37.6 \pm 2.2	36.6 \pm 2.3
Útero (mg)	168.3 \pm 4.5	208.5 \pm 11.5 *	164.1 \pm 10.4 †

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

† $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

En el análisis de la identificación del sitio de lesión se observó que en algunos animales el daño del tejido se localizaba lateral al núcleo medial del raqué (lesión fuera), en otros la lesión comprendía la región ventral (lesión parcial) y en otros comprendía la totalidad del núcleo (lesión completa) (Figuras 17, 18 y 19). Por ello, los resultados de los animales con lesión del núcleo medial del raqué se dividieron en tres grupos.

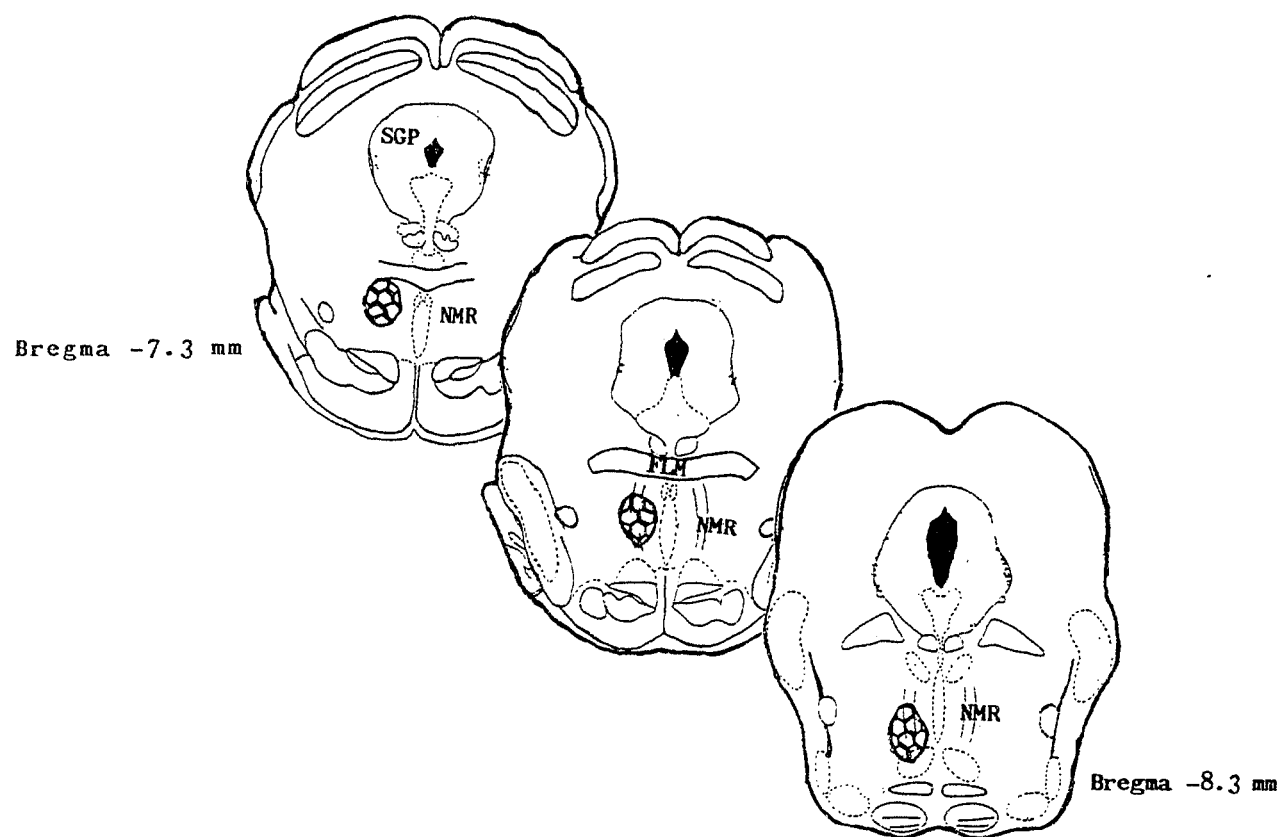


Figura 17. Corte coronal del cerebro de la rata en el que se representa de la lesión fuera del núcleo medial del rafe. El área sombreada representa la lesión inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo medial del rafe SGP (Sustancia gris periacueductal); FLM (Fascículo longitudinal medial); NMR (Núcleo medial del rafe) (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

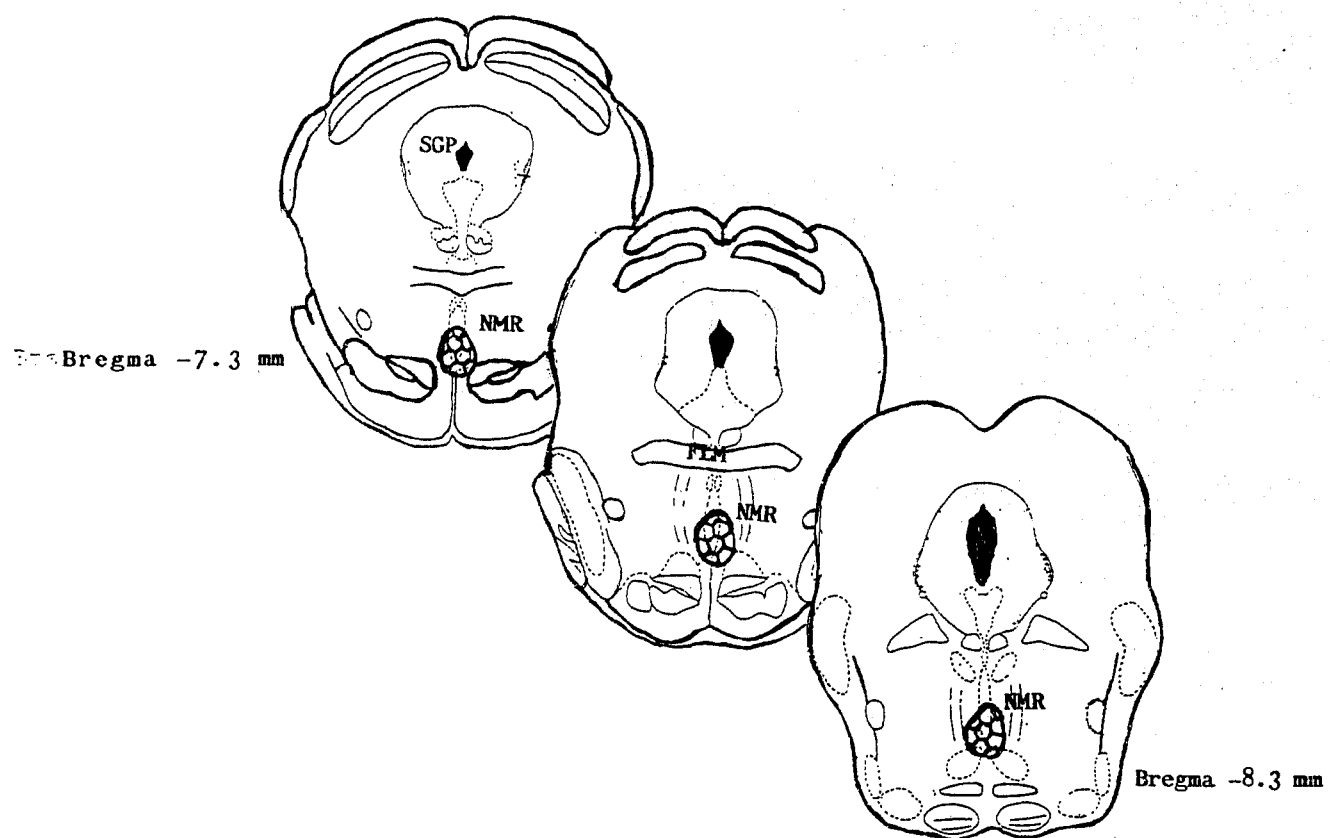


Figura 18. Corte coronal del cerebro de la rata en el que se representa de la lesión parcial del núcleo medial del raqué. El área sombreada representa la lesión inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo medial del raqué SGP (Sustancia gris periacueductal); FLM (Fascículo longitudinal medial); NMR (Núcleo medial del raqué) (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

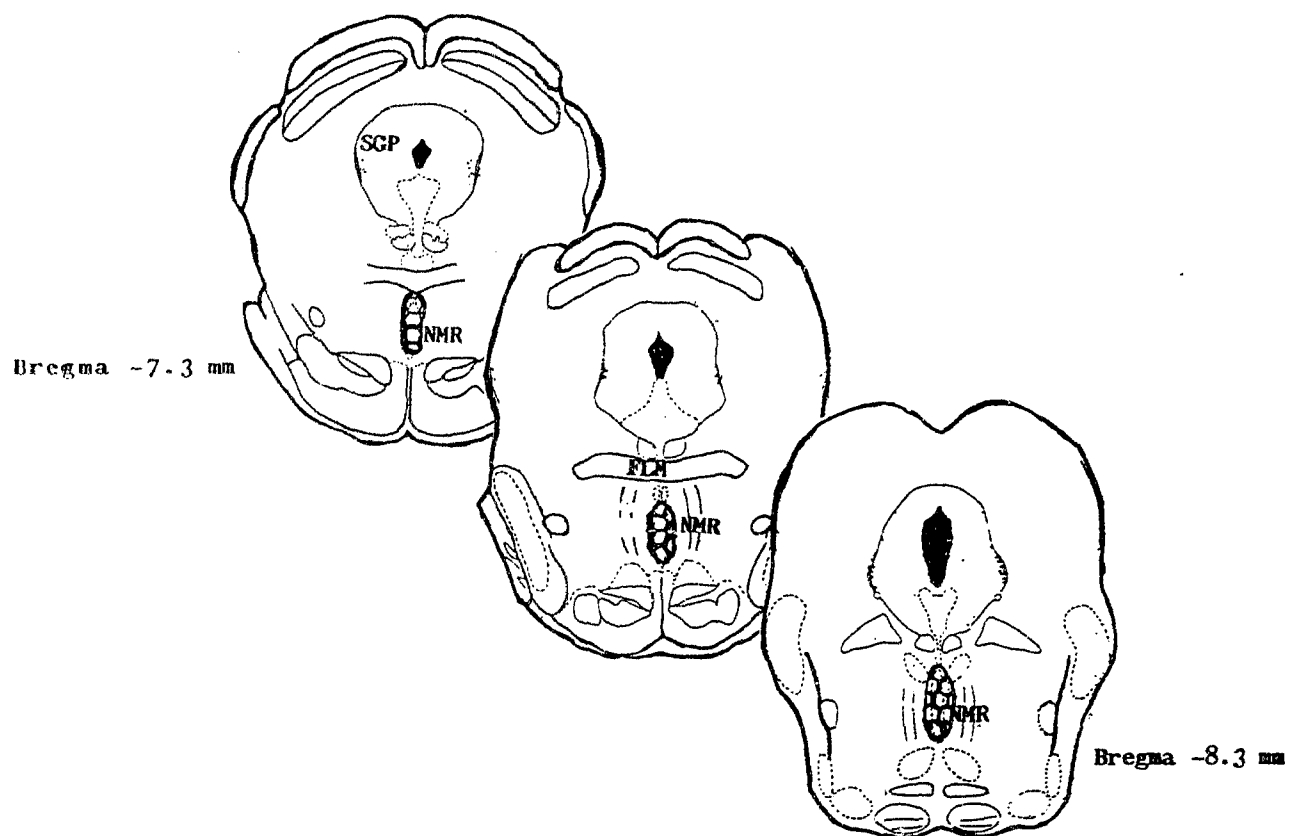


Figura 19. Corte coronal del cerebro de la rata en el que se representa de la lesión completa del núcleo medial del raqué. El área sombreada representa la lesión inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo medial del raqué. SGP (Sustancia gris periacueductal); FLM (Fascículo longitudinal medial); NMR (Núcleo medial del raqué) (Con base en el atlas de Paxinos y Watson, 1982).

La lesión completa o parcial del núcleo medial del raqué no provocó cambios significativos en los parámetros evaluados. Así mismo, cuando la lesión se realizó fuera de la zona tampoco se observaron modificaciones en los mismos (Tablas 5).

Tabla 5. Tasa de animales ovulantes (TAO) y la media \pm e.e.m. de las edades de la apertura vaginal (EAV), del primer estro (EPE), el número de ovocitos liberados, del peso corporal (PC), de los ovarios y del útero de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión fuera, parcial o completa del núcleo medial del raqué inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo medial del raqué y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	Ácido ascórbico	Lesión fuera	Lesión parcial	Lesión completa
No. de animales	14	32	10	11
EAV	41.9 \pm 0.6	44.9 \pm 0.7	44.0 \pm 1.0	43.8 \pm 1.6
EPE	42.9 \pm 0.6	45.4 \pm 0.7	45.3 \pm 1.1	45.3 \pm 1.6
TAO	10/14	28/32	7/10	10/11
No. de Ovocitos	9.3 \pm 0.7	8.5 \pm 0.4	8.3 \pm 0.6	9.0 \pm 0.8
PC (g)	123.5 \pm 2.6	126.2 \pm 1.6	130.1 \pm 3.9	122.3 \pm 5.6
Ovarios (mg)	36.6 \pm 2.3	36.7 \pm 1.3	37.9 \pm 2.8	37.9 \pm 1.9
Útero (mg)	164.1 \pm 10.4	189.6 \pm 8.8	212.5 \pm 22.5	180.8 \pm 9.3

En conjunto los resultados obtenidos en este experimento permiten pensar que en el animal prepúber, la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del raqué, modula de manera estimulante los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la primera ovulación. En cambio, la información serotoninérgica que proviene del núcleo medial parecería no estar participando en la regulación de este proceso. La falta de ovulación observada en los animales con lesión completa del núcleo dorsal del raqué o la disminución en el número de ovocitos liberados en los animales con lesión de la región central de este núcleo, posiblemente están vinculados a:

- Modificaciones en el crecimiento del folículo ovárico
- Incremento en el índice de atresia

3. Analizar los efectos de la lesión del núcleo dorsal del raquí, sobre el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico.

Para analizar si la falta de información serotoninérgica del hipotálamo que proviene del núcleo dorsal del raquí modificó el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico, y como consecuencia la ovulación, se decidió estudiar los efectos de la inyección de la 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal del raquí sobre la distribución de la población folicular.

En comparación con el grupo testigo absoluto, en los ovarios de los animales que recibieron solución salina se incrementó el número total de folículos. Cuando se analiza la población folicular en función de su diámetro, en estos animales se observó el incremento significativo en el número de folículos pequeños, mientras que los folículos medianos disminuyeron en los dos grupos con operación simulada (inyección de solución salina o ácido ascórbico) (Tabla 6). El índice de atresia únicamente se incrementó en los folículos pequeños medidos en los ovarios de los animales tratados con solución salina o ácido ascórbico ($<350\mu\text{m}$; Salina: 83.7 ± 15.6 Ácido ascórbico: 56.8 ± 12.5 vs. Testigo Absoluto: 15.2 ± 3.4 $p < 0.05$).

Tabla 6. Media \pm e.e.m. del número de folículos totales y por rango presentes en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina o con ácido ascórbico en el núcleo dorsal del raquí y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	Folículos Totales	Distribución por rango (μm)		
		< 350	350-499	>500
TA	95.8 ± 12.2	82.0 ± 11.0	13.0 ± 1.2	0.8 ± 0.4
Salina	154.7 ± 14.9 *	147.2 ± 16.1 *	6.8 ± 2.9 *	0.8 ± 0.3
Ácido ascórbico	99.5 ± 14.2 †	94.0 ± 14.2 †	4.8 ± 1.7 *	0.7 ± 0.5

* $p < 0.05$ vs. grupo TA (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

† $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Salina (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

En los animales con lesión lateral o central del núcleo dorsal del raqué, el número total de folículos medidos y su distribución por rango fue similar en relación al grupo con operación simulada, mientras que en los animales con lesión completa, el número total de folículos, pequeños fue significativamente menor y se observó una tendencia al incremento en el número de folículos preovulatorios (Tabla 7).

En todos los grupos experimentales se observó un mayor número de folículos atrésicos y en el ovario de los animales en los que se lesionó por completo el núcleo dorsal del raqué, todos los folículos preovulatorios presentaron características de atresia (Figura 20).

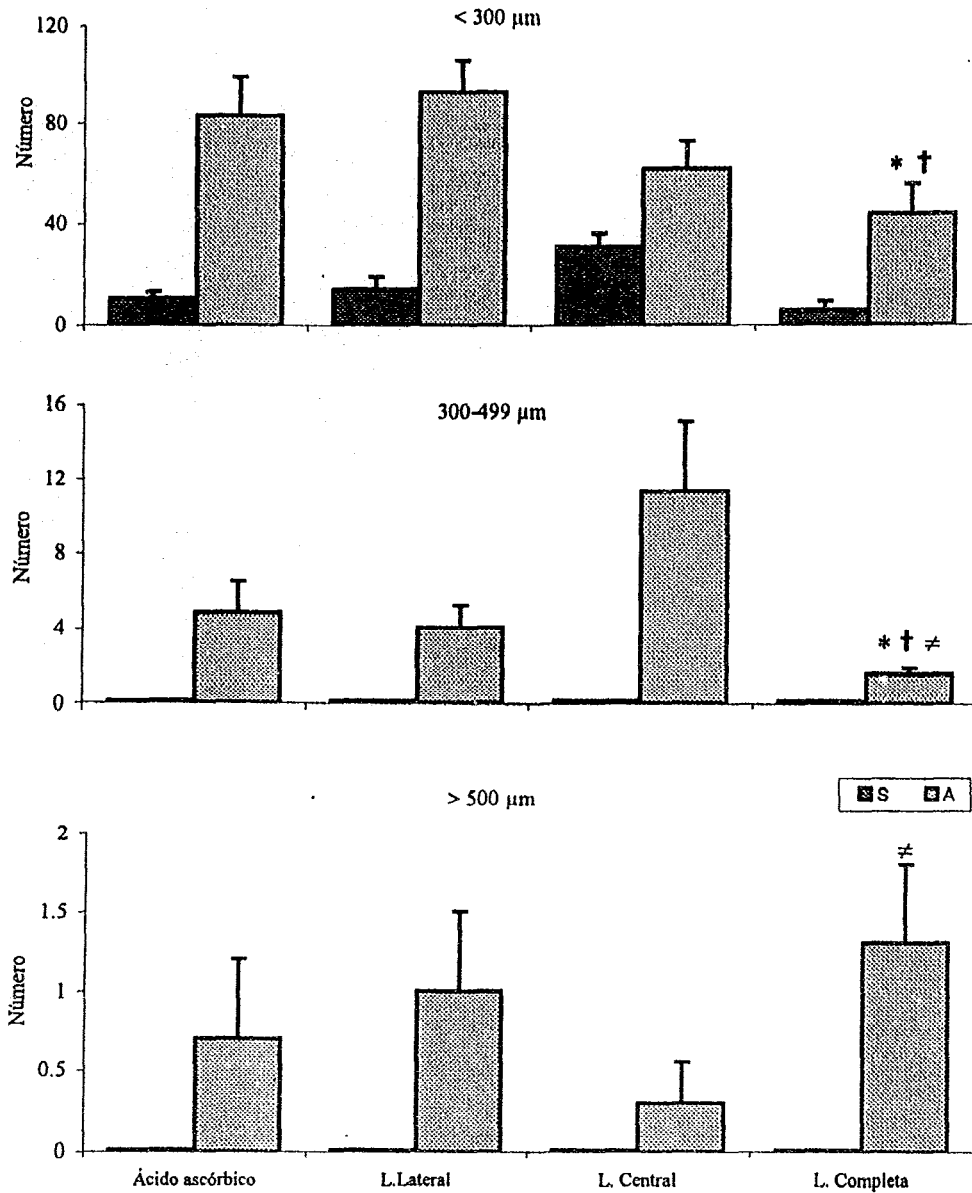
Tabla 7. Media \pm e.e.m. del número de folículos totales y por rango presentes en los ovarios de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión lateral, central o completa del núcleo dorsal del raqué inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo dorsal del raqué y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	Folículos Totales	Distribución por rango		
		< 350 μ m	350-499 μ m	>500 μ m
Ácido ascórbico	99.5 \pm 14.2	94.0 \pm 14.2	4.8 \pm 1.7	0.7 \pm 0.5
Lesión lateral	112.5 \pm 11.5	107.5 \pm 11.0	4.0 \pm 1.2	1.0 \pm 0.5
Lesión central	104.3 \pm 15.9	92.8 \pm 14.5	11.3 \pm 3.8	0.3
Lesión completa	52.8 \pm 14.0 *† \neq	50.0 \pm 13.7 *† \neq	1.5 \pm 0.3 †	1.3 \pm 0.5

* $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

† $p < 0.05$ vs. grupo con Lesión lateral (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

\neq $p < 0.05$ vs. grupo con Lesión central (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).



* $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

† $p < 0.05$ vs. grupo con Lesión lateral (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

≠ $p < 0.05$ vs. grupo con Lesión central (Kruskal-Wallis seguida de la prueba de "U" de Mann-Whitney).

Figura 20. Media \pm e.e.m. del número de folículos sano (S) y atrésicos (A) clasificados por rango presentes en los ovarios de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión lateral, central o completa del núcleo dorsal del raquí inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo dorsal del raquí y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Los resultados obtenidos en este experimento nos permiten pensar que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafe, es esencial en el mantenimiento de los mecanismos neuroendócrinos que regulan el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico que culmina con la ovulación. El hecho de que en los animales que no ovularon se observara la disminución en el número total de folículos y se incrementara el número de folículos preovulatorios con características de atresia, nos permite sugerir que por la falta de esta inervación se modificó la secreción de las gonadotropinas (FSH y LH), ya que estas hormonas al actuar en el ovario regulan la foliculogénesis, la esteroidogénesis y la ovulación (Dominguez y col., 1991; Gore-Langton y Armstrong, 1994; Greenwald y Roy, 1994; Richards, 1980). Además, dado que las propias hormonas ováricas participan en la maduración del folículo, por lo tanto, los cambios observados en el crecimiento folicular pueden ser una consecuencia de:

- Modificaciones en la secreción de FSH y LH
- Modificaciones en la secreción de las hormonas ováricas (P_4 y E_2).

4. Analizar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del rafe, sobre las concentraciones de la hormona luteinizante, la progesterona y del 17β -estradiol en el suero.

Con el propósito de analizar si las modificaciones en la ovulación y en el desarrollo folicular en los animales con lesión completa del núcleo dorsal del rafe, y la ovulación normal observada en el grupo con lesión completa del núcleo medial, están vinculadas a modificaciones en la secreción de las gonadotropinas o a la esteroidogénesis, se decidió evaluar los efectos de la inyección de la 5,6-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal o medial del rafe sobre las concentraciones séricas de LH, P_4 y 17β -estradiol.

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto no se observaron cambios en la concentración de LH en el suero de los animales con inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo dorsal del rafe. Las concentraciones de progesterona y estradiol disminuyeron en los animales que se les administró solución salina (Tabla 8).

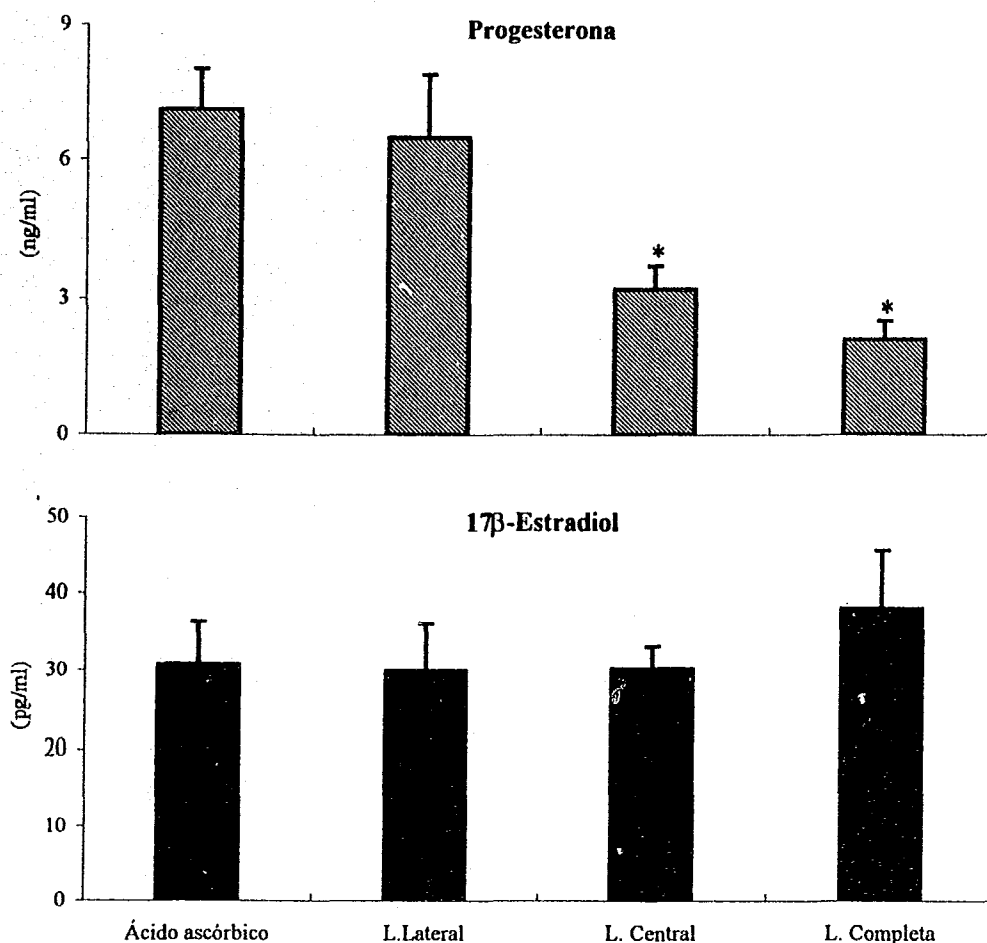
Tabla 8. Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona (P_4), del 17β -estradiol (E_2) y de la hormona luteinizante (LH) en el suero de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo dorsal del raquí y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	P_4 (ng/ml)	E_2 (pg/ml)	LH (ng/ml)
TA	6.2 ± 1.1	23.3 ± 3.5	1.4 ± 0.4
Salina	2.3 ± 0.3 *	8.9 ± 1.2 *	1.5 ± 0.2
Ácido ascórbico	7.1 ± 0.9 †	30.8 ± 5.5 †	1.4 ± 0.1

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

† $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Salina (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

En comparación con el grupo con operación simulada, la concentración de progesterona sérica en los animales con lesión central o completa del núcleo dorsal del raquí fue menor. Mientras que, en ninguno de los grupos experimentales se modificó la concentración del 17β -estradiol (Figura 21) y de LH (Lesión lateral: 1.6 ± 0.1 ; Lesión central: 1.1 ± 0.1 ; Lesión completa: 2.4 ± 0.6 vs. Ácido ascórbico: 1.4 ± 0.1 , NS).

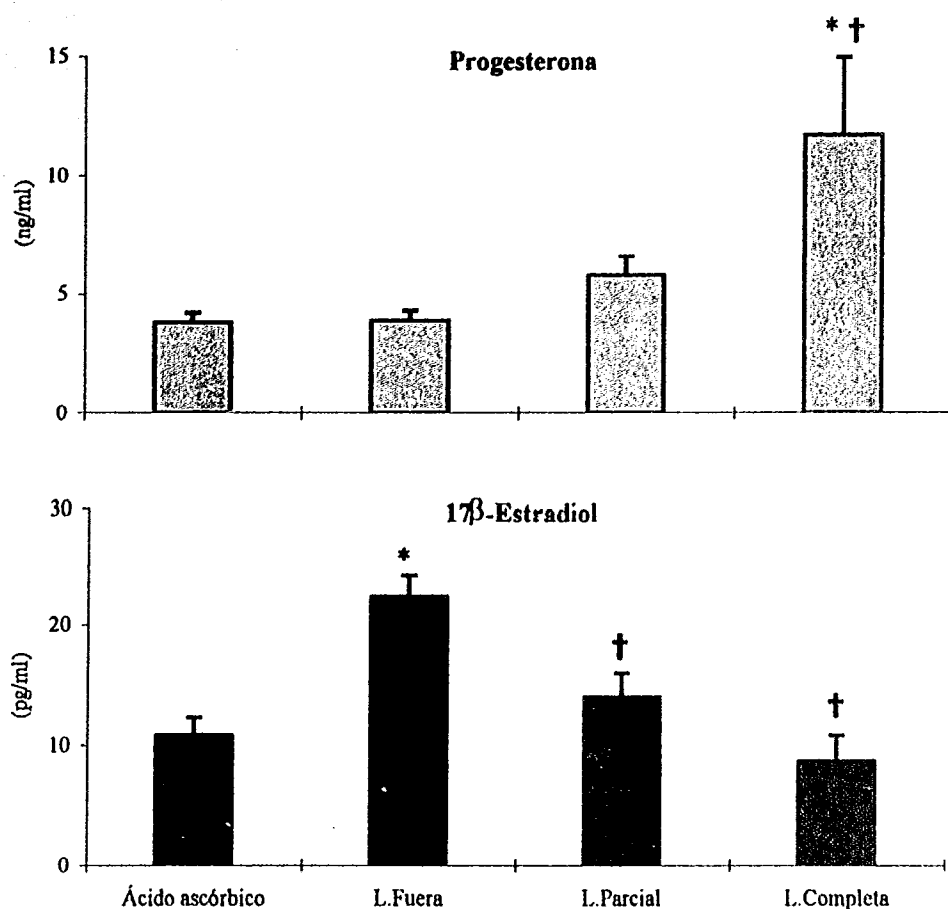


* $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 21. Media \pm e.e.m. de la concentración de progesterona y del 17β -estradiol en el suero de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión lateral, central o completa del núcleo dorsal del raquí inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g}/2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo dorsal del raquí y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

En relación a los animales testigo absoluto las concentraciones de progesterona (Salina: 5.7 ± 0.9 ; Ácido ascórbico: 3.7 ± 0.4 vs. Testigo Absoluto: 6.1 ± 1.1 , NS) y de LH (Salina: 1.2 ± 0.2 ; Ácido ascórbico: 1.4 ± 0.1 vs. Testigo Absoluto: 1.4 ± 0.4 , NS) no se modificaron en los animales con microinyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo medial del raquí, mientras que la concentración del 17β -estradiol disminuyó en los animales con salina (10.4 ± 2.2 vs. 23.3 ± 3.5 , $p < 0.05$) y con ácido ascórbico (10.8 ± 1.2 vs. 23.3 ± 3.5 , $p < 0.05$).

En los animales con lesión completa del núcleo medial del raqué la concentración de progesterona en suero fue significativamente mayor que en los animales con operación simulada. La concentración de estradiol en los animales con lesión fuera fue mayor que en el grupo con operación simulada (Figura 22). La concentración de la LH no se modificó por la microinyección del neurotóxico (Lesión fuera: 1.7 ± 0.1 ; Lesión parcial: 1.5 ± 0.2 ; Lesión completa: 1.5 ± 0.5 vs. Ácido ascórbico: 1.4 ± 0.1 , NS).



* $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

† $p < 0.05$ vs. grupo con Lesión fuera (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 22. Media \pm e.m. de la concentración de progesterona y del 17β -estradiol, en el suero de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión fuera, parcial o completa del núcleo medial del raqué inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina ($10 \mu\text{g}/2.5 \mu\text{l}$) en el núcleo medial del raqué y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Los resultados obtenidos en este experimento muestran que la eliminación de la innervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en los núcleos dorsal y medial del rafe, no provocó cambios en la concentración sérica de LH y 17β -estradiol. Este hecho nos permite pensar que no se modificó la secreción tónica de las gonadotropinas. Sin embargo, no se puede descartar que posiblemente se alteró la secreción preovulatoria de las gonadotropinas y por ello se incrementó la incidencia de atresia y se bloqueó la ovulación. Además, es posible que estos cambios estén vinculados a modificaciones en la concentración de serotonina y en la actividad del sistema serotoninérgico evaluada por la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo (anterior, medio y posterior) inducidas por la administración de 5,6-dihidroxitriptamina en los núcleos dorsal o medial del rafe.

5. Analizar los efectos de la lesión de los núcleos dorsal o medial del rafe, sobre la actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo anterior, medio y posterior.

Para analizar si la administración de la 5,6-dihidroxitriptamina modifica las concentraciones de la serotonina, del 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo anterior, medio y posterior y si dichos cambios están vinculados al inicio de la pubertad y primera ovulación en los animales con lesión de los núcleos dorsal y medial del rafe. Por ello, se decidió evaluar los efectos de la lesión química inducida por la inyección de la 5,6-DHT en estos núcleos sobre las concentraciones de serotonina, de su metabolito y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo

En el hipotálamo anterior, medio y posterior de los animales con operación simulada (inyección de salina o ácido ascórbico) en el núcleo dorsal del rafe, no se presentaron cambios significativos en la concentración de noradrenalina, MHPG, dopamina y en la relación [MHPG]/[NA] (actividad de la neurona) en comparación a los animales testigo absoluto. Sin embargo, en el hipotálamo anterior de los animales con operación simulada la concentración del DOPAC y la relación [DOPAC]/[DA] disminuyó de manera significativa [DOPAC (Salina: 0.07 ± 0.01 ; Ácido ascórbico: 0.07 ± 0.01 vs. Testigo Absoluto: 1 ± 0.05 , $p < 0.05$); [DOPAC]/[DA] (Salina: 0.3 ± 0.07 ; Ácido ascórbico: 0.3 ± 0.04 vs. Testigo Absoluto: 1.0 ± 0.05 , $p < 0.05$)).

Las concentraciones de serotonina y la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) no se modificaron en las tres regiones del hipotálamo de los animales con operación simulada, con excepción del grupo inyectado con salina en los cuales la actividad de la neurona serotoninérgica se incrementó en el hipotálamo medio. La concentración del metabolito de la serotonina en el hipotálamo medio se incrementó significativamente en el grupo con inyección de salina y en el hipotálamo anterior y posterior se observó un comportamiento similar sin que las diferencias llegaran a ser estadísticamente significativas (Tabla 9).

Tabla 9. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior, medio y posterior de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo dorsal del rafe) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	5-HT	5-HIAA	[5-HIAA]/[5-HT]
Hipotálamo Anterior			
TA	1.4 \pm 0.20	0.7 \pm 0.20	0.5 \pm 0.10
Salina	1.5 \pm 0.08	1.1 \pm 0.08	0.7 \pm 0.03
Ácido ascórbico	1.4 \pm 0.08	0.7 \pm 0.01	0.5 \pm 0.08
Hipotálamo Medio			
TA	1.3 \pm 0.3	0.4 \pm 0.10	0.4 \pm 0.06
Salina	1.2 \pm 0.08	1.0 \pm 0.08 *	0.8 \pm 0.01 *
Ácido ascórbico	1.5 \pm 0.16	0.4 \pm 0.08 †	0.3 \pm 0.05 †
Hipotálamo Posterior			
TA	2.7 \pm 0.6	0.7 \pm 0.20	0.3 \pm 0.10
Salina	1.6 \pm 0.1	1.0 \pm 0.11	0.6 \pm 0.10
Ácido ascórbico	1.8 \pm 0.2	0.6 \pm 0.10	0.4 \pm 0.06

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

† $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Salina (ANDEVA seguida de la prueba Tukey).

En comparación con el grupo con operación simulada, la concentración de noradrenalina en las tres regiones del hipotálamo no se modificó en los animales que fueron inyectados con el

fármaco en el núcleo dorsal del rapé. Sin embargo, en el hipotálamo posterior de los animales con lesión completa la concentración del MHPG se incrementó (2.3 ± 0.6 vs. 0.5 ± 0.1 , $p < 0.05$) y la relación [MHPG]/[NA] fue mayor en los animales con lesión central y completa del núcleo dorsal (Lesión central: 1.5 ± 0.5 ; Lesión completa: 1.8 ± 0.5 vs. Ácido ascórbico: 0.4 ± 0.1 , $p < 0.05$). La concentración de DOPAC incrementó en el hipotálamo medio de los animales con lesión central del núcleo (0.2 ± 0.04 vs. 0.1 ± 0.01 , $p < 0.05$).

En el hipotálamo anterior de los animales con lesión central o completa del núcleo dorsal del rapé la concentración de serotonina disminuyó sin llegar a ser estadísticamente significativa y la del 5-HIAA no se modificó, mientras que se observó la tendencia al incremento en la relación [5-HIAA]/[5-HT] (Figura 23).

En el grupo de animales con lesión parcial (lateral o central) o completa se observó la tendencia a la disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo medio, en tanto que la concentración del 5-HIAA en esta estructura se incrementó en los animales con lesión lateral o en aquellos en los que se eliminó por completo el núcleo y la relación [5-HIAA]/[5-HT] se incrementó en todos los grupos experimentales (Figura 24).

En el hipotálamo posterior de los animales con lesión completa la concentración del metabolito de serotonina fue mayor que en el grupo con operación simulada, mientras que no se modificaron la concentración del neurotransmisor y se observó la tendencia al incremento en la relación [5-HIAA]/[5-HT]. En los grupos con lesión parcial no se observaron cambios en dichos parámetros (Figura 25). En el núcleo medial de los animales con lesión completa del núcleo dorsal del rapé no modificó la concentración de serotonina y se observó el aumento de su metabolito y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (Figura 26). En los grupos con lesión parcial del núcleo se incrementó la concentración del 5-HIAA y se observó la tendencia al aumento en la actividad de la neurona serotoninérgica (Figura 27).

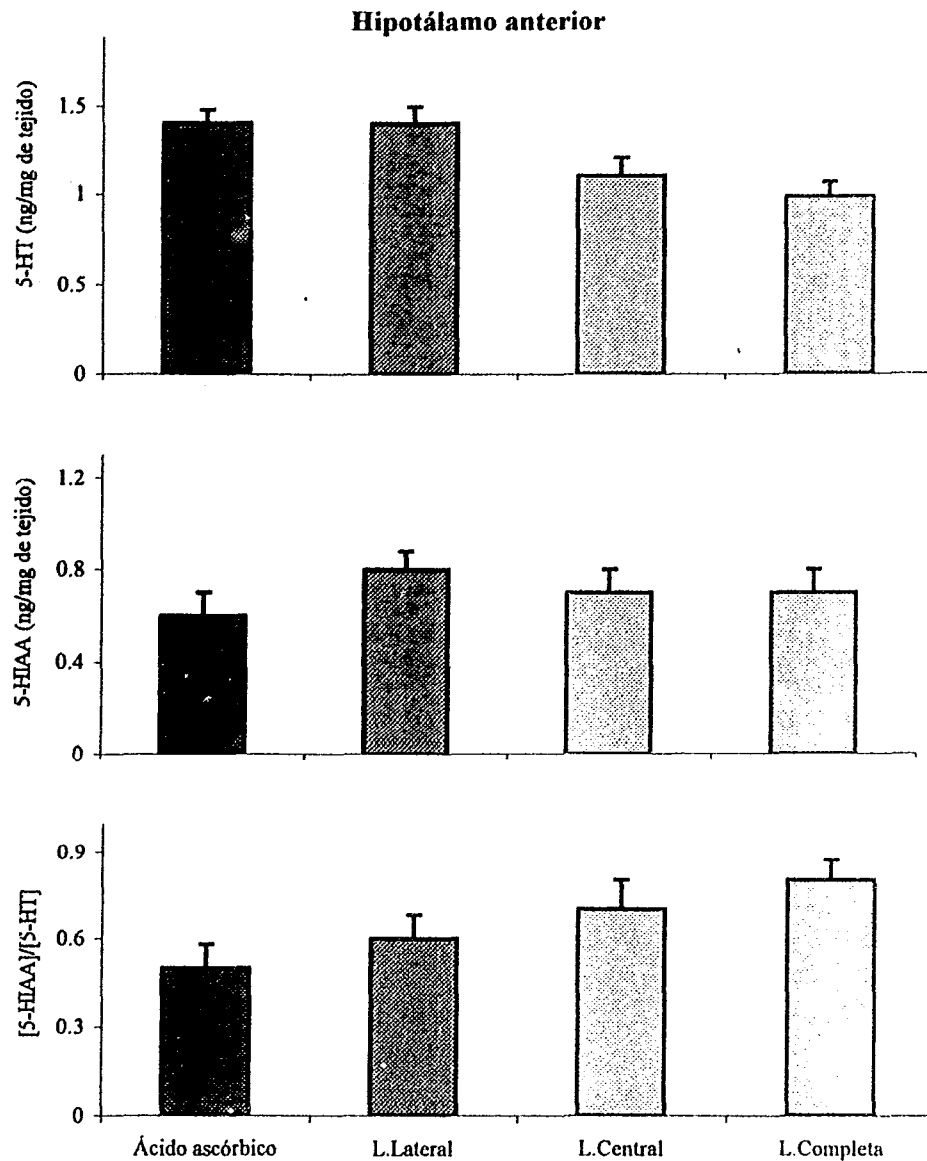
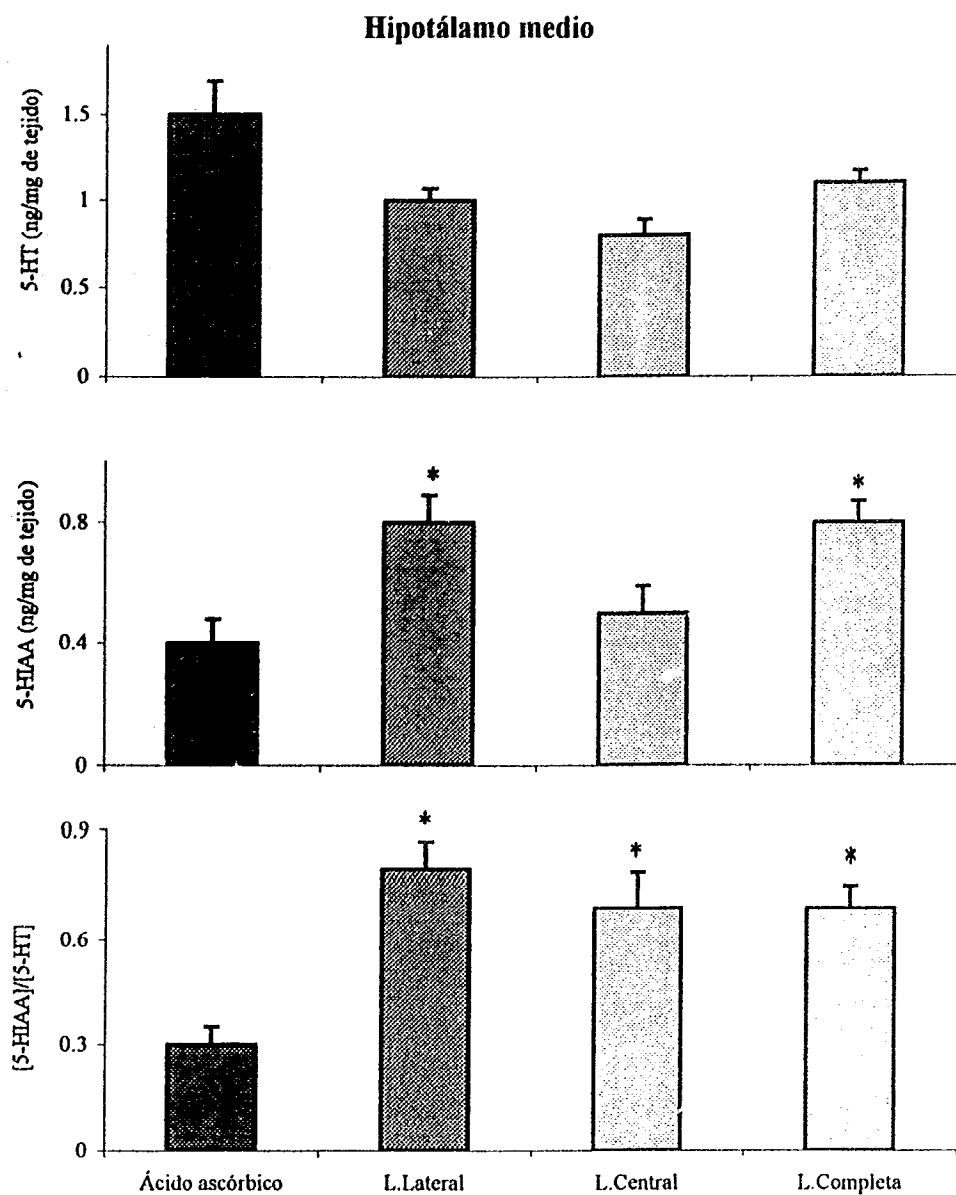
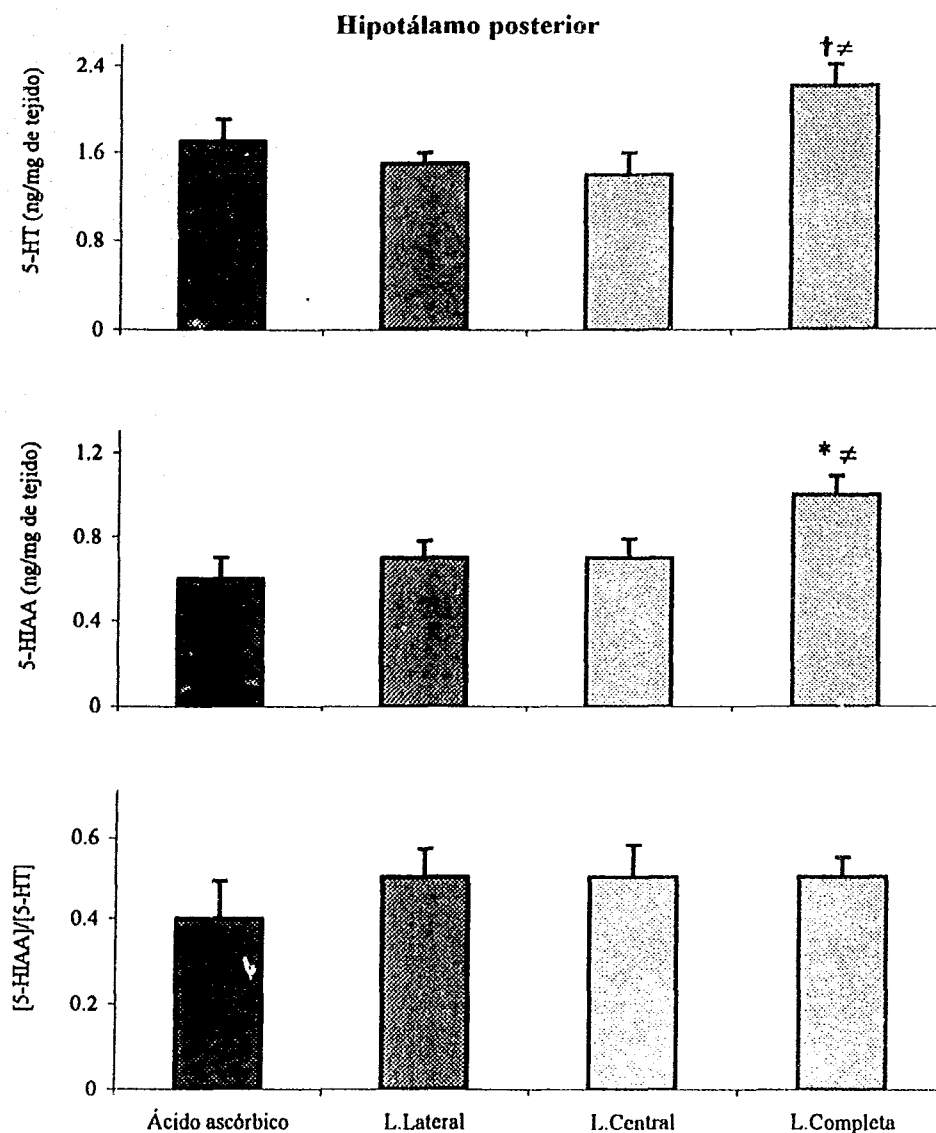


Figura 23. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión lateral, central o completa del núcleo dorsal del raquí inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo dorsal del raquí y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (ANDEVA seguida de la prueba Tukey).

Figura 24. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo medio de ratas con inyección de ácido ascórbico o lesión lateral, central o completa del núcleo dorsal del raquí inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo dorsal del raquí y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

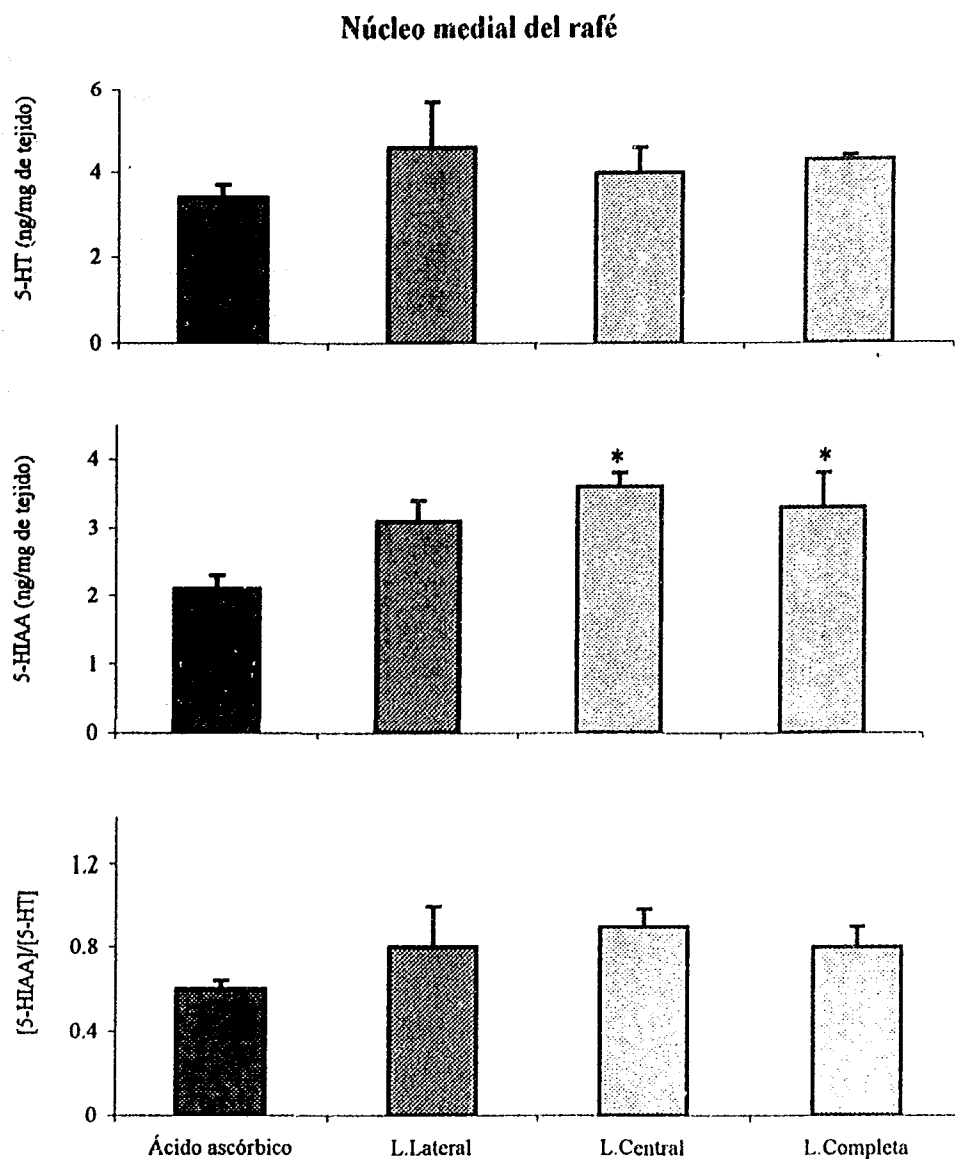


* $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

† $p < 0.05$ vs. grupo con Lesión lateral (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

≠ $p < 0.05$ vs. grupo con Lesión central (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 25. Media \pm e.c.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo posterior de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión lateral, central o completa del núcleo dorsal del rafé inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo dorsal del rafé y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



* $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Figura 26. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el núcleo medial del raqué de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión lateral, central o completa del núcleo dorsal del raqué inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo dorsal del raqué y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

La concentración de noradrenalina y dopamina en las tres regiones del hipotálamo de los animales con operación simulada (inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo medial del rafe) fue similar al grupo testigo absoluto, mientras que la concentración de DOPAC disminuyó en el hipotálamo anterior de los animales con operación simulada (Salina: 0.07 ± 0.004 ; Ácido ascórbico; 0.09 ± 0.004 vs. Testigo Absoluto 0.3 ± 0.03 , $p < 0.05$); en el hipotálamo medio aumentó la concentración del metabolito en el grupo que recibió solución salina (Salina: 0.2 ± 0.02 vs. 0.06 ± 0.02 , $p < 0.05$).

En los animales con microinyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo medial del rafe no se modificó la concentración de serotonina, de su metabolito y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo anterior y posterior. En cambio, la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo medio fue mayor en ambos grupos de animales (Tabla 10).

En comparación con el grupo con operación simulada la inyección de 5,6-DHT en el núcleo media del rafe no modificó las concentraciones de noradrenalina, dopamina, sus respectivos metabolitos y las relaciones [MHPG]/[NA] y [DOPAC]/[DA] en el hipotálamo anterior, medio y posterior.

La concentración de serotonina aumentó significativamente en el hipotálamo anterior de los animales con lesión parcial del núcleo medial del rafe (Figura 27), y no se presentaron cambios significativos en las otras regiones del hipotálamo (Figuras 28, 29). En los animales con lesión parcial o completa del núcleo, disminuyó la concentración de 5-HIAA en el hipotálamo anterior. En los animales con lesión completa del núcleo, la concentración de 5-HIAA disminuyó en el hipotálamo medio pero la diferencia no es estadísticamente significativa (Figura 28). La relación [5-HIAA]/[5-HT] no se modificó en ninguno de los grupos experimentales. En el núcleo dorsal del rafe, la concentración de serotonina aumentó en los animales con inyección de la 5,6-DHT en el núcleo medial, sin llegar a ser estadísticamente diferente, mientras que la concentración del 5-HIAA y la relación [5-HIAA]/[5-HT] presentaron un comportamiento inverso (Figura 30).

Tabla 10. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior, medio y posterior de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo medial del rafe y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

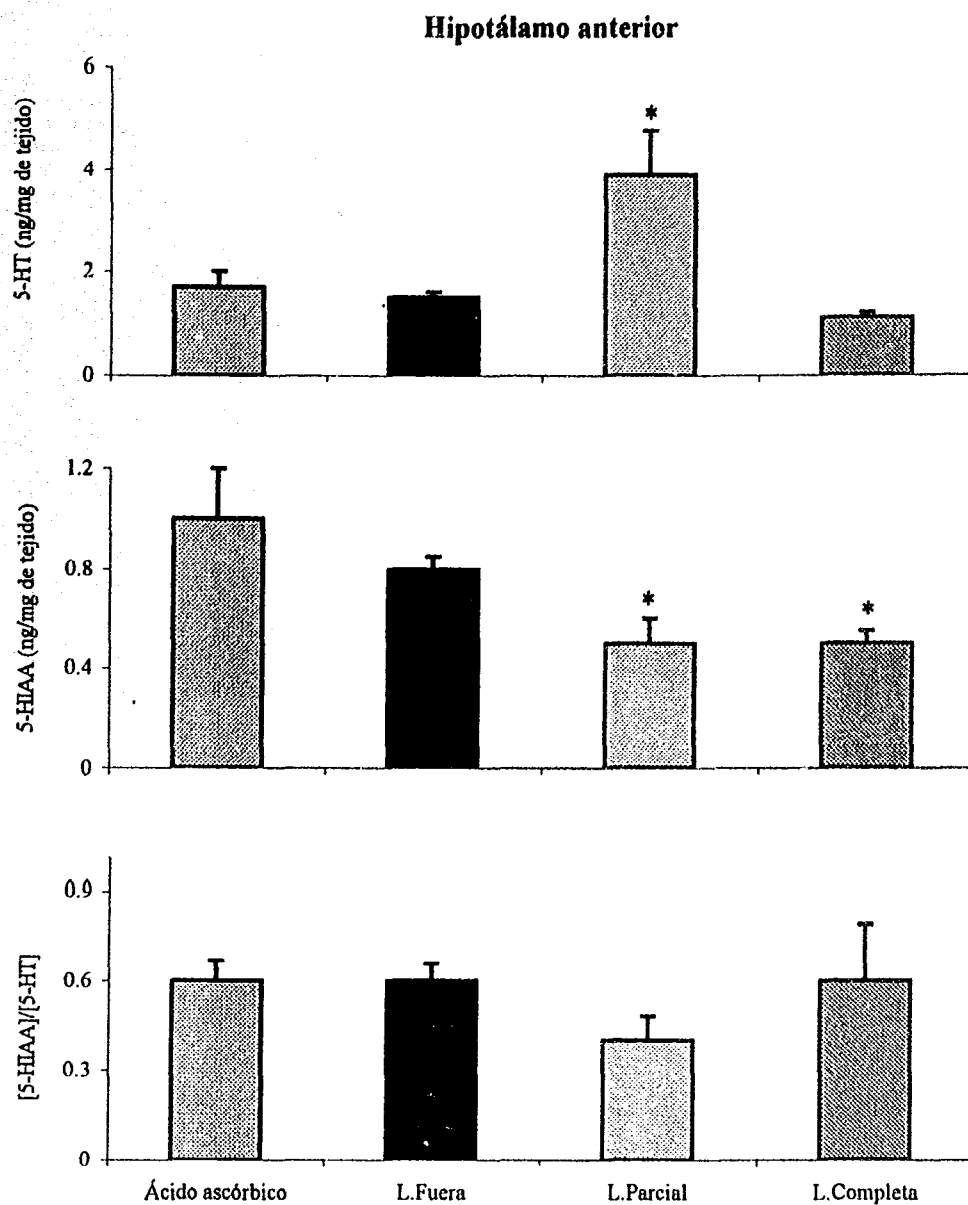
Grupo	5-HT	5-HIAA	[5-HIAA]/[5-HT]
Hipotálamo Anterior			
TA	1.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.5 \pm 0.10
Salina	1.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.5	0.5 \pm 0.06
Ácido ascórbico	1.7 \pm 0.3	1.0 \pm 0.2	0.6 \pm 0.07
Hipotálamo Medio			
TA	1.3 \pm 0.3	0.4 \pm 0.10	0.4 \pm 0.06
Salina	1.3 \pm 0.1	0.8 \pm 0.06 *	0.6 \pm 0.07
Ácido ascórbico	1.5 \pm 0.1	0.9 \pm 0.08 *	0.6 \pm 0.10
Hipotálamo Posterior			
TA	2.7 \pm 0.6	0.7 \pm 0.20	0.3 \pm 0.10
Salina	2.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.07	0.3 \pm 0.03
Ácido ascórbico	2.9 \pm 0.4	1.0 \pm 0.10	0.4 \pm 0.02

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

Tabla 10. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior, medio y posterior de ratas testigo absoluto (TA) o con inyección de solución salina o ácido ascórbico en el núcleo medial del rafé y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	5-HT	5-HIAA	[5-HIAA]/[5-HT]
Hipotálamo Anterior			
TA	1.4 \pm 0.2	0.7 \pm 0.2	0.5 \pm 0.10
Salina	1.5 \pm 0.1	0.7 \pm 0.5	0.5 \pm 0.06
Ácido ascórbico	1.7 \pm 0.3	1.0 \pm 0.2	0.6 \pm 0.07
Hipotálamo Medio			
TA	1.3 \pm 0.3	0.4 \pm 0.10	0.4 \pm 0.06
Salina	1.3 \pm 0.1	0.8 \pm 0.06 *	0.6 \pm 0.07
Ácido ascórbico	1.5 \pm 0.1	0.9 \pm 0.08 *	0.6 \pm 0.10
Hipotálamo Posterior			
TA	2.7 \pm 0.6	0.7 \pm 0.20	0.3 \pm 0.10
Salina	2.4 \pm 0.1	0.9 \pm 0.07	0.3 \pm 0.03
Ácido ascórbico	2.9 \pm 0.4	1.0 \pm 0.10	0.4 \pm 0.02

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



* $p < 0.05$ vs. grupo con inyección de Ácido ascórbico (ANDEVA seguido por la prueba de Tukey).

Figura 27. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión fuera, parcial o completa del núcleo medial del rafé inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo medial del rafé y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

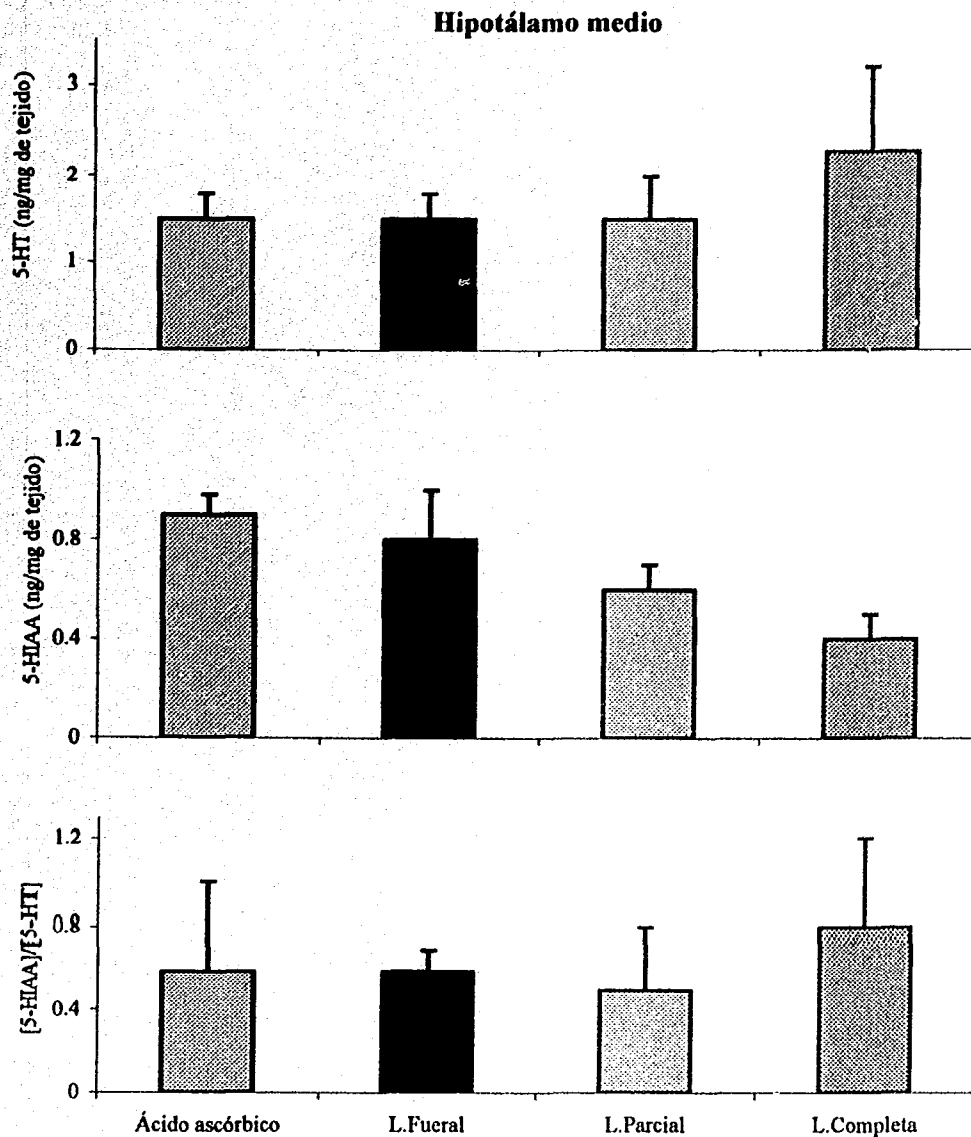


Figura 28. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo medio de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión fuera, parcial o completa del núcleo medial del rafé inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo medial del rafé y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

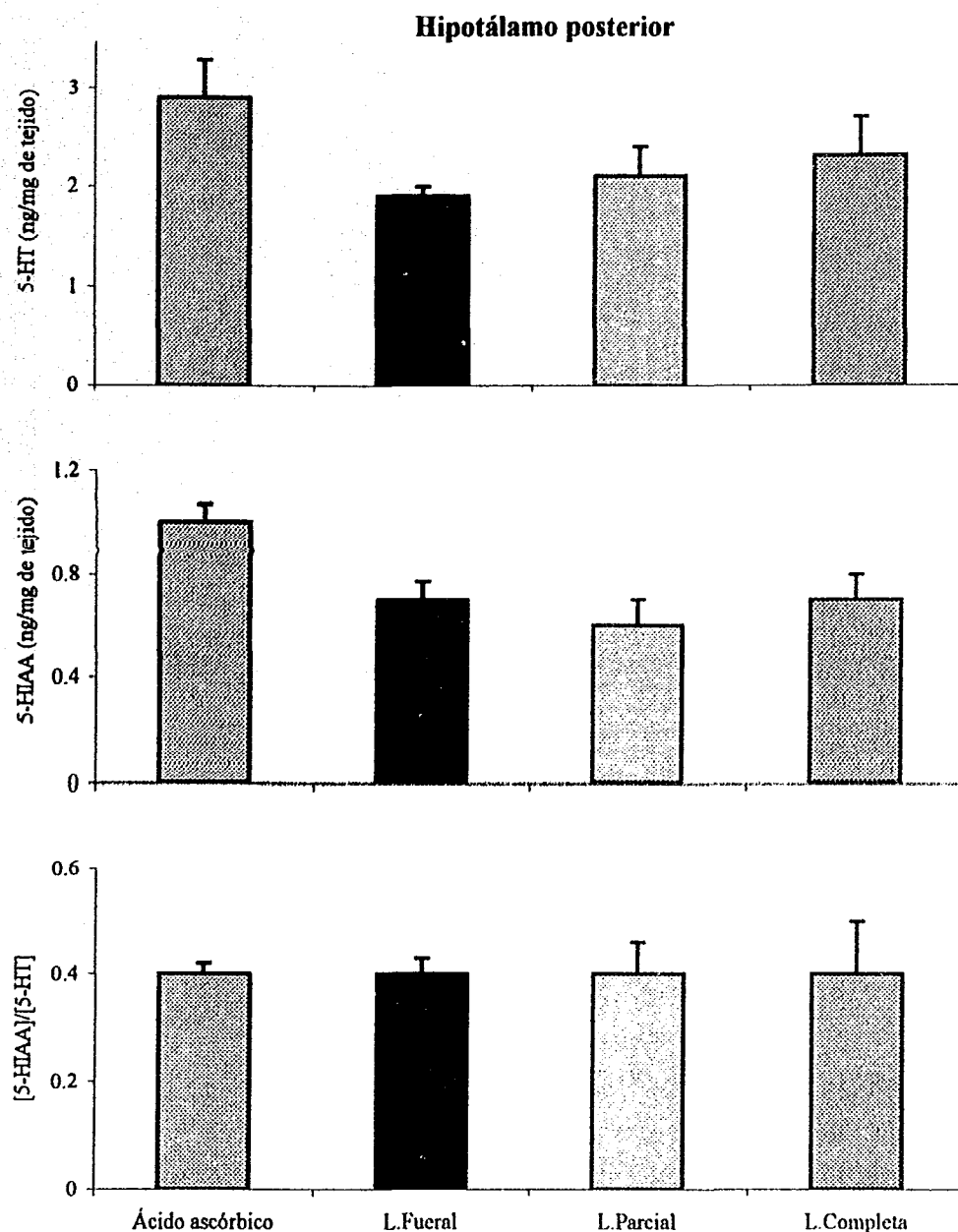


Figura 29. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo posterior de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión fuera, parcial o completa del núcleo medial del raquí inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo medial del raquí y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

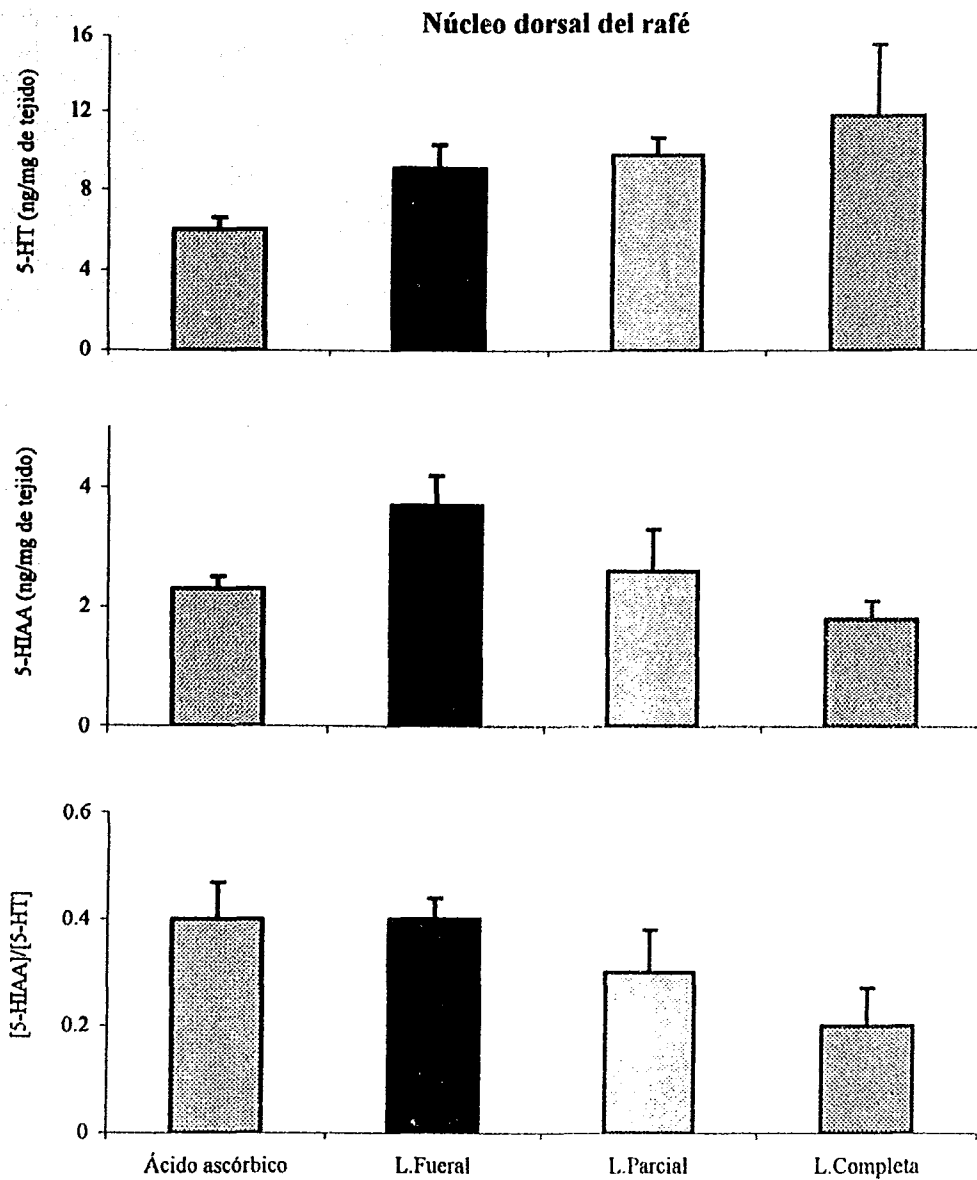


Figura 30. Media \pm e.e.m. de la concentración de serotonina (5-HT), del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el núcleo dorsal del raqué de ratas con inyección de ácido ascórbico o con lesión fuera, parcial o completa del núcleo medial del raqué inducida por la inyección de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) en el núcleo medial del raqué y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Los resultados obtenidos en este experimento muestra que la administración de la 5,6-dihidroxitriptamina en los núcleos dorsal o medial del rafe, modifica la concentración de serotonina y la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo anterior y medio. Es posible que estos cambios estén vinculados con las modificaciones observadas en la primera ovulación. Estos resultados nos permiten pensar que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal del rafe, modula de manera estimulante la secreción de las gonadotropinas, por ello la eliminación de esta información disminuye el número total de folículos y bloquea la ovulación. En cambio, la inervación que se origina en el núcleo medial del rafe, no parece estar involucrada en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la primera ovulación.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio permiten sugerir que en el animal prepúber la inervación serotoninérgica del hipotálamo anterior y medio que se origina en el núcleo dorsal del rafé, participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación, mientras que el núcleo medial del rafé no en dichos mecanismos. El hecho de que disminuyera o se bloqueara la ovulación en los animales con lesión central o completa del núcleo dorsal del rafé y se observará un menor número de folículos, el incremento de la atresia en los folículos preovulatorios y el aumento en la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica) en el hipotálamo anterior y medio, así como la ovulación normal en los animales con lesión completa del núcleo medial, apoyan la idea anterior. Una propuesta semejante ya ha sido planteada previamente para el animal prepúber (Meyer, 1978) y para el adulto (Barofsky 1975, Morello y Taleisnik, 1985; Morello y col., 1989).

Los cambios observados en los diferentes parámetros evaluados durante la etapa prepuberal de la rata, podrían estar relacionados con el inicio de la función reproductiva del animal. El aumento en el peso corporal con la edad del animal puede ser el reflejo de una mayor secreción de la GH. Ojeda y col., (1990) mostraron que durante los primeros días del desarrollo de la rata, la concentración de GH es baja, se incrementa al final de la etapa juvenil (22-32 días de edad) y continúa aumentando en los días cercanos al inicio de la pubertad (35, 38), lo que explica el mayor desarrollo del animal observado a los 38 días de edad. Además, se ha descrito que dicha hormona induce el desarrollo de la masa muscular y del esqueleto, por ello cuando existe una deficiencia en la síntesis de la GH en ratas prepúberes, éstas crecen lentamente y se retrasa la maduración sexual (Ramaley, 1979).

El mayor peso del útero observado en los días cercanos a la pubertad se acompaña del incremento en la concentración de estradiol en suero. Dicha hormona al actuar en el útero regula su crecimiento, debido a que estimula la división de las células epiteliales, el desarrollo del endometrio y miometrio, la síntesis de proteínas y la permeabilidad del útero, así como la acumulación de agua en la cavidad del útero (Montes y Luque, 1988; Steinetz, 1978). En conjunto

estos resultados y los de otros autores permiten plantear que el incremento en el peso del útero es el reflejo de la acción de los esteroides gonadales. La alta concentración de estradiol observada en los días previos a la canalización de la vagina posiblemente esté vinculado con el desarrollo del folículo ovárico, ya que se ha mostrado que durante esta etapa en el ovario de la rata, un mayor número de folículos alcanzan el estado preovulatorio (Castro, 1999), y que en este tipo de folículos las células de la granulosa por acción de las gonadotropinas, han adquirido la capacidad de aromatizar a los andrógenos (Domínguez y col., 1991; Greenwald y Roy, 1994). Por ello, es posible pensar que el incremento en la concentración de estradiol conforme avanza el desarrollo del animal es el reflejo de la síntesis de los estrógenos por los folículos.

La tendencia al incremento en la concentración de serotonina observada en el hipotálamo anterior y medio, concuerdan con lo reportado por Watts y Stanley (1984), quienes señalan que estos cambios son el reflejo de un mayor número de neuronas serotoninérgicas funcionales. Por ello, las modificaciones en la concentración de la amina no están vinculadas a la inmadurez de este sistema de neurotransmisión, dado que se ha mostrado que alrededor de la tercera semana de vida se ha completado la inervación serotoninérgica de las diferentes estructuras del sistema nervioso central y en particular de los núcleos del hipotálamo (Watts y Stanley, 1984; Becún-Villalobos y Libertun, 1986) y la capacidad de la neurona de almacenar al neurotransmisor se ha incrementado (Karki y col., 1962), lo cual se traduce en la disminución en la concentración del metabolito de la serotonina (5-HIAA) y en la relación [5-HIAA]/[5-HT]. Dichos eventos podrían estar relacionados con la disminución en la actividad de la enzima que metaboliza a la serotonina.

Los cambios en la concentración de serotonina y su metabolito, así como en la relación [5-HIAA]/[5-HT] es un indicador de la actividad del sistema serotoninérgico. La idea de que esta proporción es una estimación de la actividad neuronal, ha sido propuesta previamente por Kerdelhué (1984) y Shannon y col. (1990) en el animal adulto y por Bourgoin y col. (1977) y Watts y Stanley (1987) en el prepúber, debido a que es un balance entre la tasa de síntesis, de utilización y de degradación de la serotonina. Además, se sugiere que la actividad de la MAO (enzima principal que degrada a la amina) está vinculada con las modificaciones en las concentraciones del 5-HIAA y de la 5-HT.

Los cambios en la relación del metabolito de la serotonina/serotonina en el hipotálamo anterior y medio observados en los días previos a la canalización vaginal (35-38 días), posiblemente están vinculados con la regulación de la secreción del "pico" preovulatorio de las gonadotropinas que precede a la primera ovulación. Esta idea ha sido planteada previamente por Advis y col., (1978) en el animal prepúber y en el adulto por Keldelhué y col., (1989).

El retraso en las edades de la apertura y del primer estro vaginal observada en los animales con operación simulada del núcleo dorsal del rafe, pueden ser el resultado de la modificación temporal en la secreción de los estrógenos que precede al pico preovulatorio de las gonadotropinas. Este evento puede estar vinculado a modificaciones en la secreción de las gonadotropinas provocado por la anestesia con pentobarbital o con éter. Esta idea es apoyada por las evidencias experimentales que señalan que en la rata adulta en el día del proestro, la aplicación de éter como anestésico disminuye la secreción de la FSH y LH a las 24 horas y la ovulación no se modifica (Flores y col., 1990; Barofsky, 1979). Por ello, es posible que la disminución en la secreción de las gonadotropinas en los días que sucedieron a la aplicación de la anestesia, provocó modificaciones en la esteroidogénesis que se tradujo en el retraso del inicio de la pubertad observado en los animales con operación simulada. La idea de que el pentobarbital influye directamente en la esteroidogénesis ha sido planteada previamente por Meyer y col. (1983), quienes mostraron que en el animal prepúber la administración del fármaco incrementa la secreción de pregnenolona e inhibe la síntesis de progesterona (producto intermediario en la ruta de síntesis de los estrógenos).

Otra posible explicación al retraso en la canalización de la vaginal y del primer estro, es el estrés inducido por la anestesia o la manipulación quirúrgica, lo que resultó en el incremento de la secreción de la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) por la hipófisis y de los corticoides por la suprarrenal. Estudios previos de otros autores muestran que el incremento en la secreción de estas hormonas se traduce en el retraso en el inicio de la pubertad, debido a que pueden actuar de forma inhibitoria en los mecanismos que regulan este proceso (Ramaley, 1979). Además, se ha mostrado que en la rata hembra prepúber el implante de cortisol en el hipotálamo medio induce la pérdida de la ciclicidad, disminuye el peso de los ovarios y del útero, eventos que se acompañan del bloqueo

de la ovulación en el día del primer estro vaginal. Estos resultados les permitió sugerir que los corticoides regulan de manera inhibitoria la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas (Smith y col., 1971).

Sin embargo, no se puede descartar que el incremento en la edad de la canalización vaginal y del primer estro, sea el reflejo del efecto provocado por la modificación de una vía neural localizada en la sustancia gris periacueductal, dado que existen evidencias de que la información neural que se origina en esta región es fundamental para que se produzca la ovulación (Dominguez-González y Chávez, 1994). Es posible que al introducir la aguja de inyección se seccionarán vías neurales en la sustancia gris periacueductal (SGP) involucradas en la regulación del inicio de la pubertad. La existencia de esta vía neural no ha sido descrita hasta el momento. A diferencia de lo observado en los animales con operación simulada del núcleo dorsal, en el grupo de operación simulada del medial no se modificaron las edades de la canalización de la vagina y del primer estro vaginal. Este evento posiblemente está vinculado a que en el último grupo experimental al introducir la aguja de inyección no se dañó la SGP.

El hecho de que en los animales con inyección de 5,6-DHT en los núcleos dorsal o medial del rafe no presentaran retraso en las edades de la apertura y primer estro vaginal, y que la concentración sérica de estradiol no se haya modificado, apoyarían la idea de que la secreción de estrógenos fue suficiente para inducir la canalización de la vaginal. En apoyo a esta idea se ha descrito que en la rata prepúber los estrógenos propician la ruptura del epitelio que cubre a la vagina, estimulan el crecimiento de las células epiteliales de este órgano, la pérdida de su núcleo y que adquieran la apariencia cornificada y por otra parte se ha observado que cuando se administran anticuerpos antiestrógenos se inhibe la cornificación de las células epiteliales (Steinetz, 1978).

Experimentos realizados en la rata, muestran que el sistema serotoninérgico estimula la secreción de la hormona de crecimiento, al actuar en el hipotálamo e inducir la secreción de la somatostatina, que estimula la síntesis y la liberación de la GH en la hipófisis (Kacsóh y col., 1993; Lindstrom y Ohlsson 1987). Sin embargo, en nuestro estudio la lesión del núcleo dorsal o medial

del **rafé no modificó el peso corporal de los animales en el día del primer estro vaginal**. Estos resultados indican que posiblemente la información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en los núcleos del rafé no es fundamental en el control de la secreción de la GH y como consecuencia en el incremento en peso corporal de los animales. Resultados semejantes, muestran que la lesión térmica de este núcleo no modifica el incremento en la masa corporal (Ayala y col., 1994). En cambio, cuando se administra la p-cloroanfetamina (inhibidor de la síntesis de serotonina (pCA)) por vía sistémica, el peso de los animales si disminuye (Ayala y col., 1993). Es posible que en este último estudio, la administración del fármaco haya afectado la secreción de la GH, idea es apoyada el hecho de que muestran que cuando a la rata macho se le administra por vía sistémica la pCA, la concentración de serotonina en el hipotálamo disminuye hasta un 40 % (Sanders-Bush y col., 1972, Sanders-Bush y Massari, 1977), lo que indica que el fármaco atraviesa la barrera hematoencefálica y modifica la secreción de la GH, evento que probablemente no ocurre al dejar integro a uno de los núcleos del rafé.

La tendencia al incremento en el número de ovocitos liberados observada en los animales con lesión lateral del núcleo dorsal del rafé, concuerda con los resultados obtenidos por Ayala y col. (1994). Es posible que esta respuesta sea el resultado de la alteración de una vía neural entre el SNC y el ovario. Esta idea es apoyada por los resultados que muestran que cuando se realiza la lesión térmica de la región izquierda o derecha del núcleo dorsal del rafé, el número de ovocitos liberados por el ovario ipsilateral a la lesión se incrementa y en el contralateral no se modifica (Ayala y col., 1994). En conjunto estas evidencias permiten pensar que a falta de ésta vía neural posiblemente de tipo "inhibitoria", un mayor número de folículos alcanzan la etapa de preovulatorios y liberan su ovocitos en el día del estro vaginal. La idea de la comunicación neural entre SNC y la gónada ha sido planteada previamente por otros autores (Chávez y col., 1987; Cruz y col., 1986; Domínguez y col., 1991; Morales y col., 1998). Además, no se puede descartar que la parte del núcleo que no se dañó, fue suficiente para que la actividad del sistema serotoninérgico no se modificara y se desarrollaran los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la primera ovulación. El hecho de que en el hipotálamo anterior no se observaran cambios en la relación [5-HIAA]/[5-HT] y el crecimiento y maduración folicular apoyan ésta interpretación (Figura 31).

A diferencia de lo observado en el grupo de animales con lesión lateral del núcleo dorsal del rafe, en los que se lesiona la región central disminuye el número de ovocitos liberados en el día del primer estro vaginal y en los animales en los que se lesiona completamente el núcleo se bloquea la ovulación. Este último resultado concuerda con lo reportado previamente por Meyer (1978) cuando administra la 5,7-dihidroxitriptamina en el núcleo dorsal y por lo reportado por Ayala y col., (1994), quienes muestran que la lesión de esta región bloquea la ovulación.

El bloqueo de la ovulación o la disminución en el número de ovocitos liberados observada en los animales con microinyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal del rafe, puede ser el resultado de modificaciones en la secreción de las gonadotropinas. Una explicación a la diferencia en la respuesta de los animales ante la lesión del núcleo dorsal es que en los que ovularon no se eliminó completamente la fuente de serotonina que proviene del núcleo dorsal, debido a que únicamente se lesionó la parte central del mismo, por lo que los cambios en la secreción de la FSH y LH no fueron suficientes para bloquear la ovulación en el día del primer estro vaginal.

La disminución en el número de ovocitos liberados observada en los animales con lesión central del núcleo dorsal del rafe se acompañó de una ligera disminución en la concentración de serotonina en el hipotálamo medio y del incremento en la relación [5-HIAA]/[5-HT], lo que permite suponer que en estos animales el sistema serotoninérgico se encuentra activo; sin embargo, la concentración del 5-HIAA disminuyó ligeramente por lo que es posible que la utilización del neurotransmisor y su degradación estén disminuidas (Figura 32). A diferencia de lo observado en este grupo, la tendencia al incremento en el número de ovocitos liberados en el grupo con lesión lateral del núcleo dorsal del rafe, también se acompañó de la disminución ligera en la concentración de la amina y el incremento en la concentración del 5-HIAA y de la relación [5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo medio, por lo que es posible que en estos animales la neurona serotoninérgica si está activa. Con base en estos resultados es posible que la diferencia en la respuesta ovulatoria en ambos grupos de animales es el resultado de una participación diferencial de las neuronas serotoninérgica en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

La respuesta diferencial observada en la ovulación ante la eliminación completa o parcial del núcleo dorsal del raqué (central o lateral), podría indicar que entre las neuronas que conforman el núcleo dorsal existen diferencias en su participación en la regulación de la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación. En apoyo a esta interpretación se ha mostrado que en el mono la distribución de los receptores a estrógenos no es homogénea en las neuronas de este núcleo, debido a que en la región lateral del mismo existe un mayor número de células que expresan estos receptores (Alves y col., 1998). Sin embargo, en la rata no existen evidencias que apoyen esta idea.

El análisis del sitio de lesión en los animales donde se bloqueó la ovulación muestra que el daño inducido por la administración del fármaco abarca la totalidad del núcleo. Este hecho nos permite pensar que la inervación serotoninérgica que se origina en esta estructura participa de manera estimulante en la secreción cíclica de la LH y la ovulación. Esta afirmación es apoyada por los estudios de Meyer (1978) quien mostró que la administración de 5,7-dihidroxitriptamina bloquea la ovulación inducida por el tratamiento con PMSG en la rata prepúber y por los resultados de Van de Kar y col. (1980) quienes señalan que el mismo tratamiento en el macho disminuye la secreción de la LH en plasma.

La falta de ovulación observada en los animales con lesión completa del núcleo dorsal del raqué, puede ser el reflejo del bloqueo en la secreción de las gonadotropinas y en particular de la LH, debido a la disminución en la concentración de la serotonina y al incremento en el 5-HIAA en el hipotálamo anterior y medio, por lo que es posible sugerir que la serotonina que se sintetiza es utilizada y degradada rápidamente, lo que se traduce en una mayor actividad de este sistema de neurotransmisión como lo muestran los resultados obtenidos de la relación [5-HIAA]/[5-HT]. Diversos autores han mostrado que la 5,6-dihidroxitriptamina es un fármaco selectivo para las neuronas serotoninérgicas y que sus efectos se manifiestan en la disminución significativa en la concentración de serotonina aún después de haber transcurrido 30 días (Baumgarten, 1972; Breeser y col., 1974; Collu, 1978). Con base en estas evidencias es posible que los cambios en la ovulación estén vinculados al sistema serotoninérgico que se origina en el raqué dorsal, ya que no se

observaron modificaciones en el sistema noradrenérgico y dopaminérgico en el hipotálamo de estos animales.

En la rata adulta la lesión electroquímica del núcleo dorsal del rafé, disminuye la secreción preovulatoria de LH en la tarde del proestro y en el día del estro bloquea la ovulación (Morello y Taleisnik, 1985). En los animales prepúberes con lesión térmica de este núcleo, la administración de hCG restaura la ovulación en el 60 % de ellos (Ayala, y col., 1994). Estos resultados nos llevan a corroborar la idea de que la eliminación de la inervación que se origina en el núcleo dorsal del rafé modifica la secreción de la LH y la ovulación.

El bloqueo de la ovulación en los animales con lesión completa del núcleo dorsal del rafé, se acompañó del incremento en la actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo medio. El aumento en la actividad de este sistema de neurotransmisión puede ser el resultado de que a falta del núcleo dorsal, es el medial el que toma los comandos de regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación. Esta idea es apoyada por las evidencias anatómicas que muestran que existe una comunicación neural entre ambos núcleos (Frazer y Hensler, 1994), y que dichos núcleos inervan de manera diferencial varias regiones del hipotálamo (Johnson y Crowley 1986; Van de Kar y Lorens, 1979; Villar y col., 1984). Además, el hecho de que en el núcleo medial de estos animales se observara un ligero aumento en la concentración de serotonina y de su metabolito, apoyan la hipótesis de que la falta de ovulación se debe a que el centro inhibitorio está activado. La idea de que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo medial del rafé, participa de manera inhibitoria en los mecanismos que regulan la secreción de LH ha sido planteada previamente en la rata adulta (Morello y Taleisnik, 1985) (Figura 33).

Diversos autores han mostrado que durante el desarrollo prepuberal de la rata hembra, el sistema serotoninérgico no parece intervenir en la modulación de la secreción de la FSH (Moguilevsky y col., 1985; Arias y col., 1990; Becún-Villalobos y Lacau-Mengido, 1989). Sin embargo, el bloqueo de la ovulación observado en los animales con lesión completa del núcleo dorsal del rafé, posiblemente también está vinculado a modificaciones en la secreción de la FSH. Además, dado que la FSH actúa en el folículo facilitando su crecimiento y el reclutamiento de los

que van a responder al “pico preovulatorio” de la LH (Greenwald y Roy, 1994), es posible que la falta de ovulación observada en estos animales puede ser el resultado de la disminución del número de folículos totales pequeños y medianos, y a que los folículos que alcanzaron la etapa de preovulatorios eran atrésicos, debido a la disminución en la secreción de FSH, como resultado de la falta de serotonina.

El crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico son regulados por las gonadotropinas, factores de crecimiento y esteroides ováricos (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994; Hirshfield y Migdley 1978). En nuestro caso, el análisis de la población folicular indica que el bloqueo en la ovulación se acompañó de la disminución del número de folículos e incremento de la atresia. Es posible que a falta de la innervación que se origina en el núcleo dorsal del rafe, la concentración de gonadotropinas fue insuficiente para mantener el desarrollo de los folículos que iniciaron su desarrollo, como consecuencia se incrementó la incidencia de atresia, lo que se traduce en la disminución del número de folículos observado en los ovarios de estos animales. Esta idea es apoyada por las evidencias que señalan que en la rata adulta el bloqueo de la secreción preovulatoria de las gonadotropinas o la hipofisectomía incrementan la atresia (Hsueh y col., 1994), y en cambio en la rata prepúber la administración de PMSG disminuye este evento (Villavicencio y Domínguez, 1993).

El hecho de que en los ovarios de los animales con lesión completa del núcleo dorsal, todos los folículos preovulatorios presentaran características de atresia, no se puede explicar por una disminución en la secreción de la LH, debido a que en estos animales no se observaron cambios en la concentración de esta hormona en el día del primer estro vaginal. Sin embargo, es posible que la secreción preovulatoria de LH se modificara y como consecuencia no se llevara a cabo la maduración final del folículo, la ruptura del mismo y la liberación del ovocito.

Otro evento que posiblemente contribuyó al aumento de la atresia en los folículos de los animales con lesión completa del núcleo dorsal del rafe, sería la producción de testosterona, dado que dicha hormona es atretogénica (Greenwald y Roy, 1994; Hsueh y col., 1994) Es posible que en estos animales se incrementara la producción de los androgénos (androstenediona y

testosterona) como resultado de cambios en la esteroidogénesis, ya que se ha descrito que el proceso de atresia está vinculado a la disminución en la actividad de la enzima aromataasa, debido a la modificación en la secreción de las gonadotropinas y en particular de la FSH (Greenwald y Roy, 1994). Se ha descrito que la administración de andrógenos a ratas prepúberes disminuye el peso de la gónada, incrementa el número de células picnóticas de la granulosa y la degeneración del ovocito. Además, los andrógenos que no son aromatizados inhiben la actividad de la enzima aromataasa y estimulan la síntesis de progesterona en las células de la granulosa (Hsueh y col., 1994).

Además de los posibles cambios en la secreción de las gonadotropinas en los animales con lesión completa del núcleo dorsal del rafé, el bloqueo de la ovulación observado en estos animales, puede estar vinculado a modificaciones en la información neural que le llega a la gónada y que se traduce en la disminución de la respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas. Sin embargo, hasta el momento no se ha mostrado que el ovario reciba inervación serotoninérgica y que exista comunicación entre este núcleo y la gónada. Por ello, es posible que la información neural que sale del rafé dorsal no actúe directamente en el ovario, sino como un modulador de otra vía que llegue y regule las funciones del ovario (nervio vago, nervio ovárico y plexo ovárico). En apoyo a esta interpretación se ha mostrado que en los animales con lesión parcial del núcleo dorsal del rafé aumenta el número de ovocitos liberados por el ovario ipsilateral a la lesión del núcleo y en el ovario contralateral a la lesión aumenta el número de folículos preovulatorios (Ayala y col., 1994).

Diversas evidencias muestran que los nervios ováricos superior y vago participan en la modulación del crecimiento y diferenciación del folículo ovárico (Ojeda y col., 1994; Chavéz y col., 1987; Cruz y col., 1986; Morales y col., 1993). En la rata prepúber la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior disminuye el número total de folículos y el estímulo hormonal con PMSG no restaura este evento (Morales y col., 1996). Así mismo, cuando en el animal adulto se secciona el nervio vago se incrementa el número de folículos preovulatorios (Cruz y col., 1986). Con base en estas evidencias es posible sugerir que la información neural que recibe la gónada modula la reactividad del folículo a las gonadotropinas.

Se ha mostrado que la médula espinal recibe inervación serotoninérgica principalmente de los paquetes celulares del núcleo del puente del rafé (B1-B5) y en menor proporción del núcleo dorsal y medial del rafé (Soghomonian y col., 1988), además de que el receptor 5-HT₃ se localiza en neuronas periféricas como el ganglio cervical, el cordón espinal y el nervio vago (inervación que llega al ovario) (Kia y col., 1995). Estas evidencias anatómicas nos permiten apoyar la idea de que existe una comunicación neural entre el núcleo del rafé y el ovario. Sin embargo al momento no contamos con datos que apoyen esta idea.

La disminución en la concentración de progesterona sérica en los animales con lesión completa del núcleo dorsal del rafé, posiblemente es el reflejo de que no se desarrollaron cuerpos lúteos o se formó un menor número de ellos en los ovarios de estos animales, debido a una menor secreción de LH. En diversos estudios se ha mostrado que la principal fuente de progesterona en la gónada es el cuerpo lúteo (Zeleznik y Fairchild, 1994), y que dicha estructura se forma por acción de la LH que induce la luteinización de las células de la teca de los folículos preovulatorios que liberan los ovocitos (Hiller, 1994).

Al parecer la información serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo medial del rafé parecería no estar involucrada en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación, ya que la eliminación de este núcleo no modificó las edades de la canalización de la vagina y del primer estro y la ovulación. Una interpretación semejante ha sido planteada previamente en la rata adulta (Héry y col., 1978; Barofsky, 1975). Sin embargo, esta idea no concuerda con lo reportado por Barofsky (1979), Meyer (1978), Morello y col. (1985, 1989), quienes señalan que la función de este núcleo parece ser de tipo inhibitorio.

En el animal prepúber la administración de 5,7-dihidroxitriptamina en el núcleo medial del rafé bloquea la ovulación inducida por la PMSG y disminuye la recaptura de serotonina en la eminencia media (Meyer, 1978), mientras que en la rata adulta la estimulación eléctrica de dicho núcleo bloquea la ovulación y disminuye la concentración plasmática de LH y cuando se lesiona este núcleo no se observan modificaciones en dichos parámetros (Morello y Taleisnik, 1985). Esta última evidencia experimental concuerda con lo observado en nuestro estudio. Por ello, es posible

que la ovulación normal observada en los animales con lesión completa del núcleo medial, es el resultado de la acción que ejerce el núcleo dorsal, debido a que se le ha atribuido a esta inervación un efecto estimulante sobre la secreción de las gonadotropinas, y a falta del núcleo medial es el dorsal el que toma el comando en la regulación de la ovulación. El hecho que en estos animales se incrementara la concentración de la serotonina en el rafé dorsal apoyan esta idea (Figura 34).

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la microinyección de 10 µg de la 5,6-DHT en los núcleos dorsal o medial del rafé de la rata prepúber (30 días de edad), no eliminó completamente la concentración de serotonina en las tres regiones del hipotálamo, por lo que es posible pensar que la amina cuantificada en estos animales es aportada por el núcleo que permanece sin daño, debido a que dichos núcleos inervan las diferentes regiones del hipotálamo entre otras regiones del encéfalo (Soghomonian y col., 1988; Van de Kar y Lorens, 1979; Villar y col., 1984). Otra posible explicación es que dicha amina se sintetizó en el hipotálamo, ya que se sugiere que este proceso se puede llevar a cabo en los núcleos ventromedial y dorsomedial (Montagne y Calas, 1988; Takeuchi, 1988).

La fuente principal de serotonina del hipotálamo medio (núcleo arcuato y la eminencia media) proviene del núcleo dorsal del rafé (Van de Kar y Lorens, 1979; Villar y col., 1980) y el núcleo medial envía fibras serotoninérgicas principalmente al hipotálamo anterior (área preóptica media y área hipotalámica anterior) (Van de Kar y Lorens, 1979). Estas evidencias morfológicas concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, en el que se observa que la lesión del núcleo dorsal disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo medio, mientras que cuando se elimina el núcleo medial, la concentración de este neurotransmisor disminuye ligeramente en el hipotálamo anterior y medio. En conjuntos estos resultados apoyan la idea de que la inervación serotoninérgica que se origina en ambos núcleos del rafé regulan la síntesis y liberación de la GnRH.

A diferencia de lo observado en el hipotálamo anterior y medio, la lesión parcial o completa del rafé dorsal no modificó la concentración de la serotonina y de la relación

[5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo posterior, mientras que la eliminación de la información que proviene del medial si provocó ligeros cambios. Por lo anterior se puede sugerir que la fuente principal de serotonina de esta región del hipotálamo proviene posiblemente del núcleo medial. Al respecto se ha mostrado que cuando se administra la 5,7-dihidroxitriptamina en el raqué medial, la concentración de serotonina disminuye en prácticamente todos los núcleos que conforman al hipotálamo (Van de Kar y col., 1980). Sin embargo hasta el momento no existen evidencias anatómicas que muestren la relación del núcleo medial del raqué con el hipotálamo posterior.

Los resultados de este estudio apoyan la idea de que existen dos sistemas serotoninérgicos separados anatómicamente que regulan la secreción de las gonadotropinas de forma inversa. La inervación serotoninérgica del hipotálamo anterior y medio que se origina en el núcleo dorsal ejerce un efecto estimulante en la secreción de gonadotropinas. El hecho de que se bloqueará la ovulación y se incrementará el índice de atresia en los animales con lesión apoyan la idea. Mientras que la información serotoninérgica del hipotálamo anterior que proviene del núcleo medial parecería no participar o ejerce un efecto inhibitorio, el hecho de que en estos animales no se observarán modificaciones en la ovulación apoyan esta idea.

En conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal y medial del raqué participan de manera diferencial en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y en la primera ovulación.

[5-HIAA]/[5-HT] en el hipotálamo posterior, mientras que la eliminación de la información que proviene del medial si provocó ligeros cambios. Por lo anterior se puede sugerir que la fuente principal de serotonina de esta región del hipotálamo proviene posiblemente del núcleo medial. Al respecto se ha mostrado que cuando se administra la 5,7-dihidroxitriptamina en el rafé medial, la concentración de serotonina disminuye en prácticamente todos los núcleos que conforman al hipotálamo (Van de Kar y col., 1980). Sin embargo hasta el momento no existen evidencias anatómicas que muestren la relación del núcleo medial del rafé con el hipotálamo posterior.

Los resultados de este estudio apoyan la idea de que existen dos sistemas serotoninérgicos separados anatómicamente que regulan la secreción de las gonadotropinas de forma inversa. La inervación serotoninérgica del hipotálamo anterior y medio que se origina en el núcleo dorsal ejerce un efecto estimulante en la secreción de gonadotropinas. El hecho de que se bloqueará la ovulación y se incrementará el índice de atresia en los animales con lesión apoyan la idea. Mientras que la información serotoninérgica del hipotálamo anterior que proviene del núcleo medial parecería no participar o ejerce un efecto inhibitorio, el hecho de que en estos animales no se observarán modificaciones en la ovulación apoyan esta idea.

En conjunto, estos resultados nos permiten sugerir que la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal y medial del rafé participan de manera diferencial en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y en la primera ovulación.

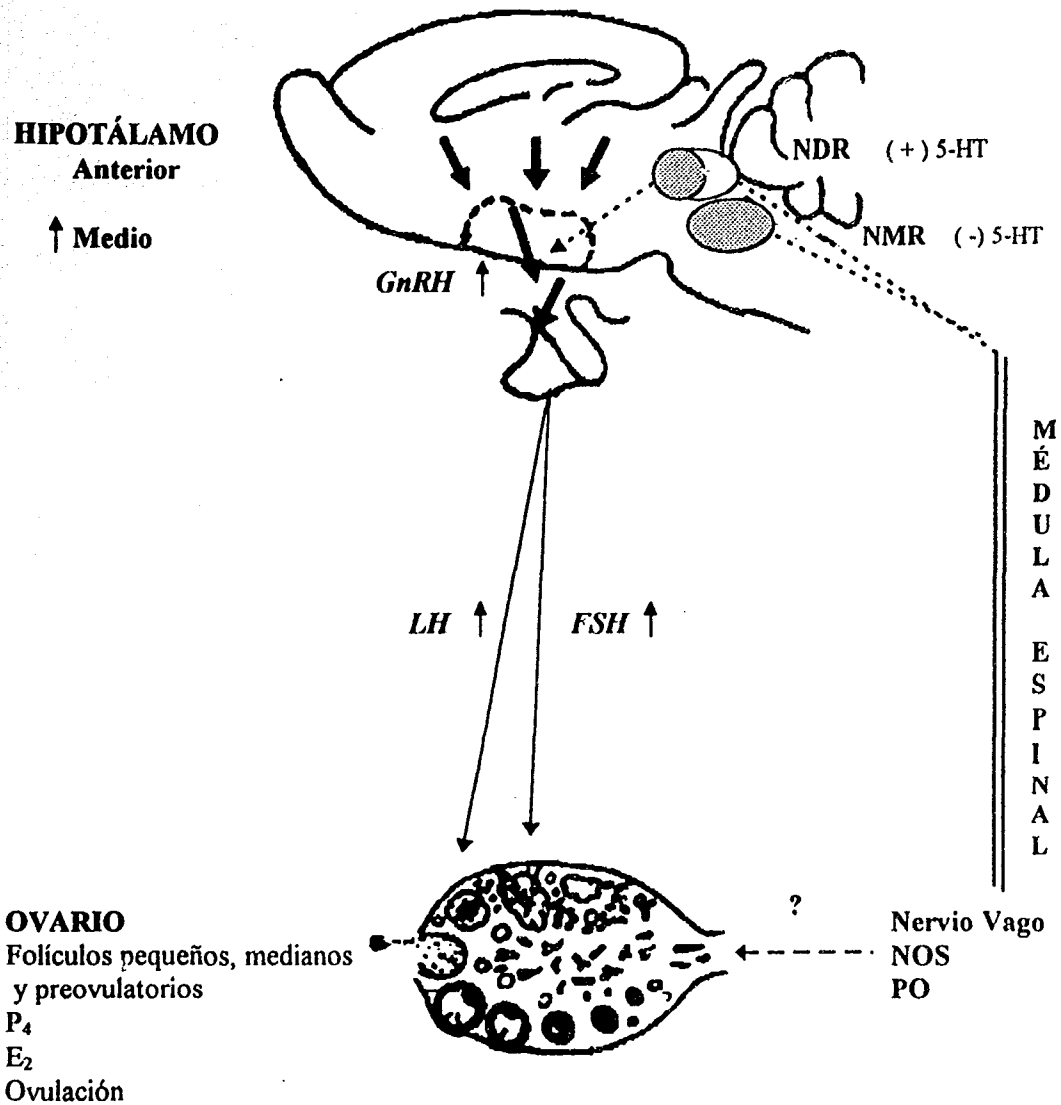


Figura 31. Modelo propuesto de la posible participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal en el animal de 30 días de edad con lesión lateral. La flecha (↑) marcada en el hipotálamo indica la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica), el signo (+) indica efectos estimulantes, NDR (núcleo dorsal del rafe), NMR (núcleo medial del rafe), GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona foliculo estimulante), P₄ (progesterona), E₂ (estradiol), NOS (nervio ovárico superior) y PO (plexo ovárico).

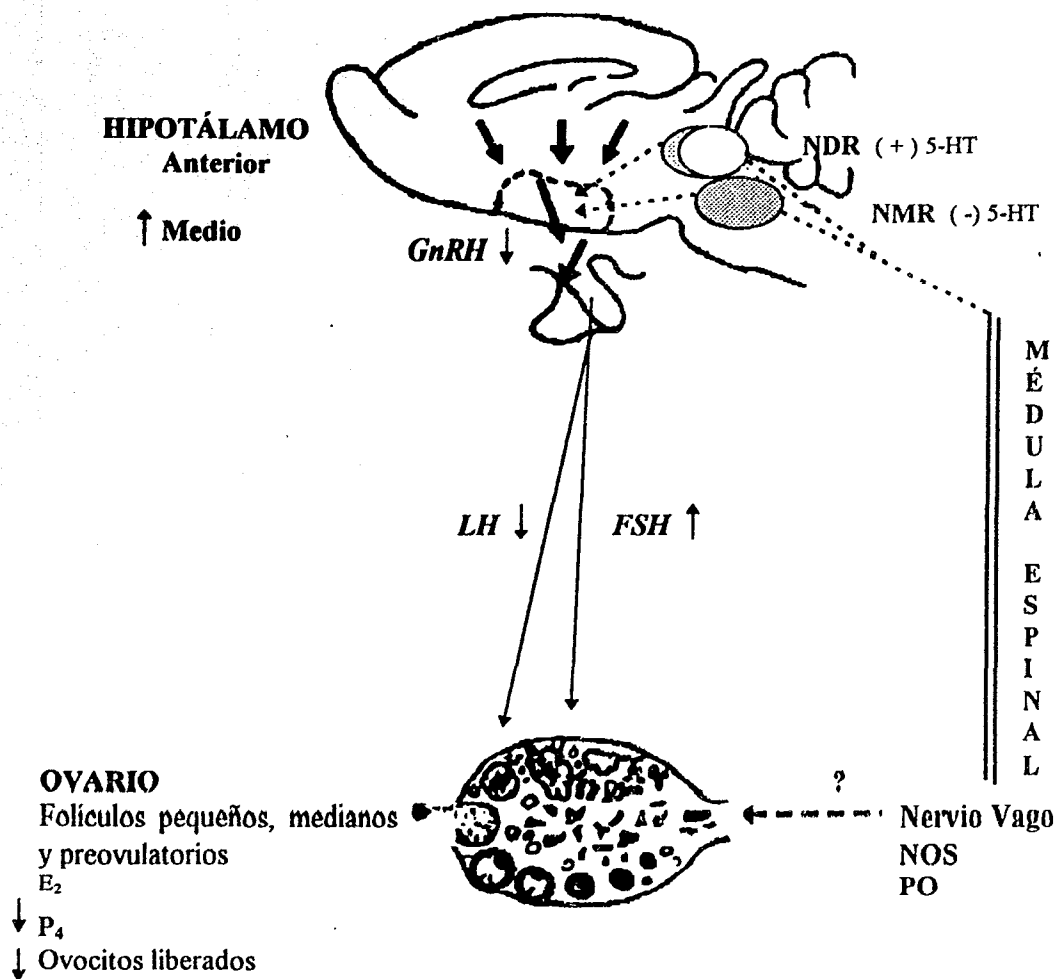


Figura 32. Modelo propuesto de la posible participación de la innervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal en el animal de 30 días de edad con lesión central. La flecha (↑) marcada en el hipotálamo indica la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica), el signo (+) indica efectos estimulantes, el (-) inhibitorios, NDR (núcleo dorsal del raquídeo), NMR (núcleo medial del raquídeo), GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona foliculo estimulante), P₄ (progesterona), E₂ (estradiol), NOS (nervio ovárico superior) y PO (plexo ovárico).

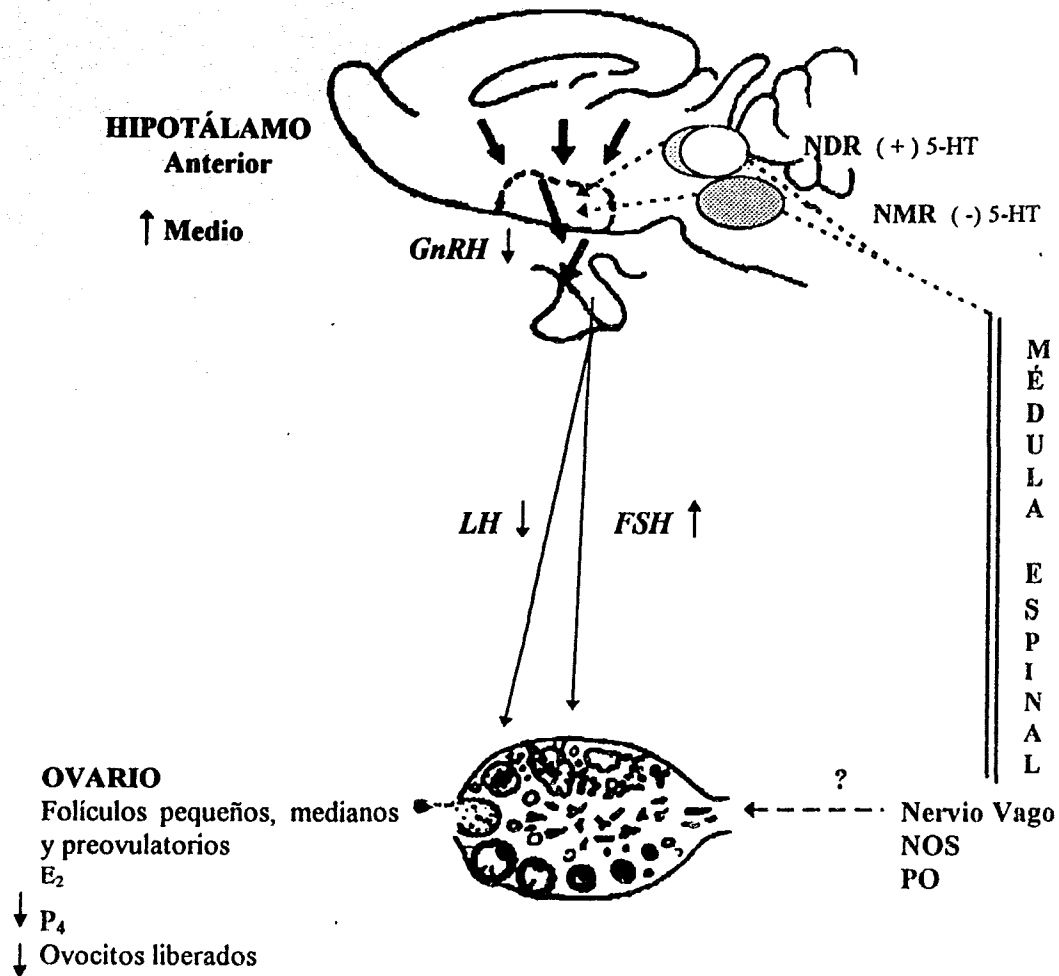


Figura 32. Modelo propuesto de la posible participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal en el animal de 30 días de edad con lesión central. La flecha (↑) marcada en el hipotálamo indica la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica), el signo (+) indica efectos estimulantes, el (-) inhibitorios, NDR (núcleo dorsal del rafé), NMR (núcleo medial del rafé), GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona folículo estimulante), P₄ (progesterona), E₂ (estradiol), NOS (nervio ovárico superior) y PO (plexo ovárico).

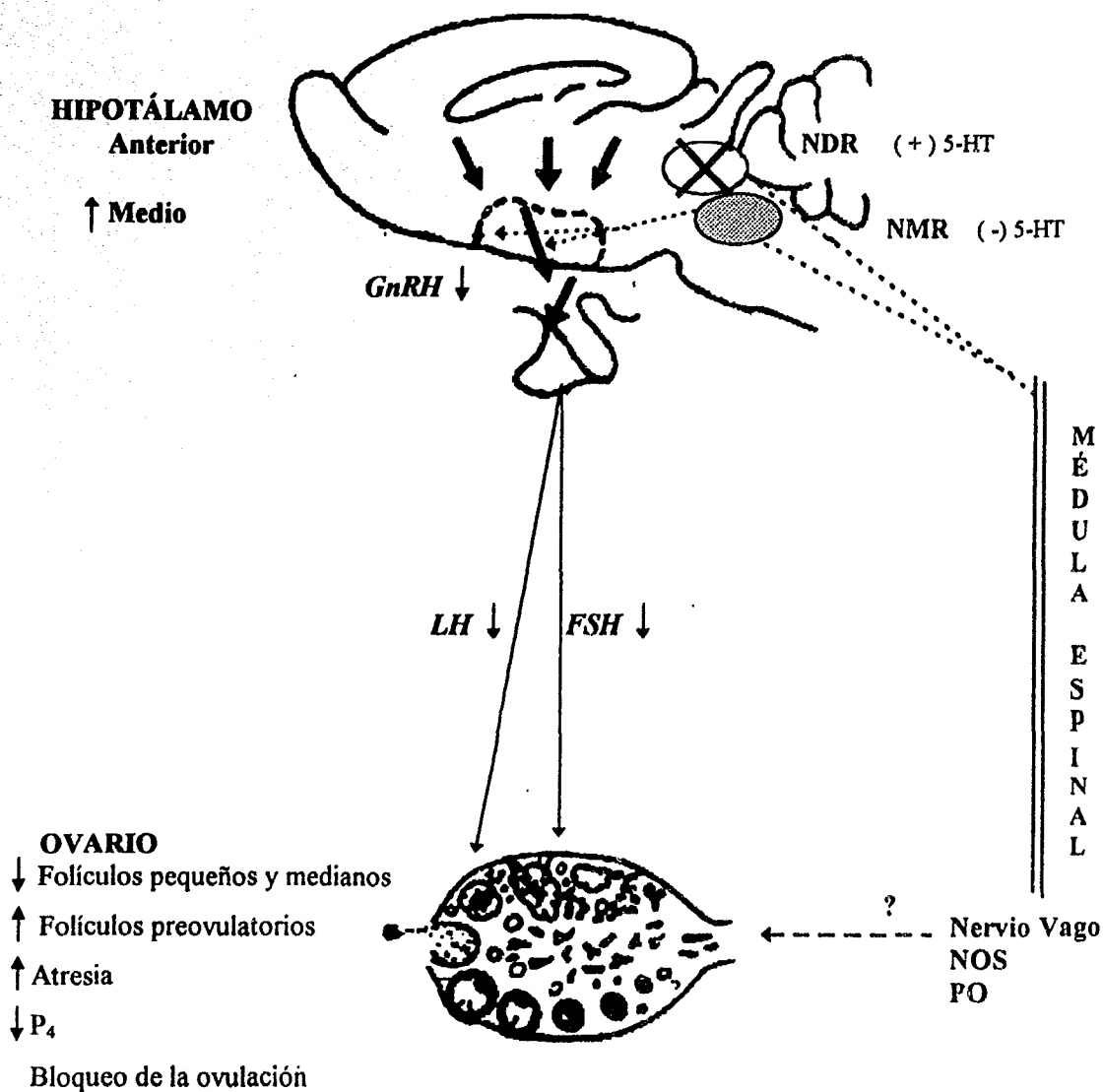


Figura 33. Modelo propuesto de la posible participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo dorsal en el animal de 30 días de edad con lesión completa. La flecha (↑) marcada en el hipotálamo indica la relación [5-HIAA]/[5-HT] (actividad de la neurona serotoninérgica), el signo (+) indica efectos estimulantes, el (-) inhibitorios, NDR (núcleo dorsal del rafe), NMR (núcleo medial del rafe), GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona foliculo estimulante), P₄ (progesterona), E₂ (estradiol), NOS (nervio ovárico superior) y PO (plexo ovárico).

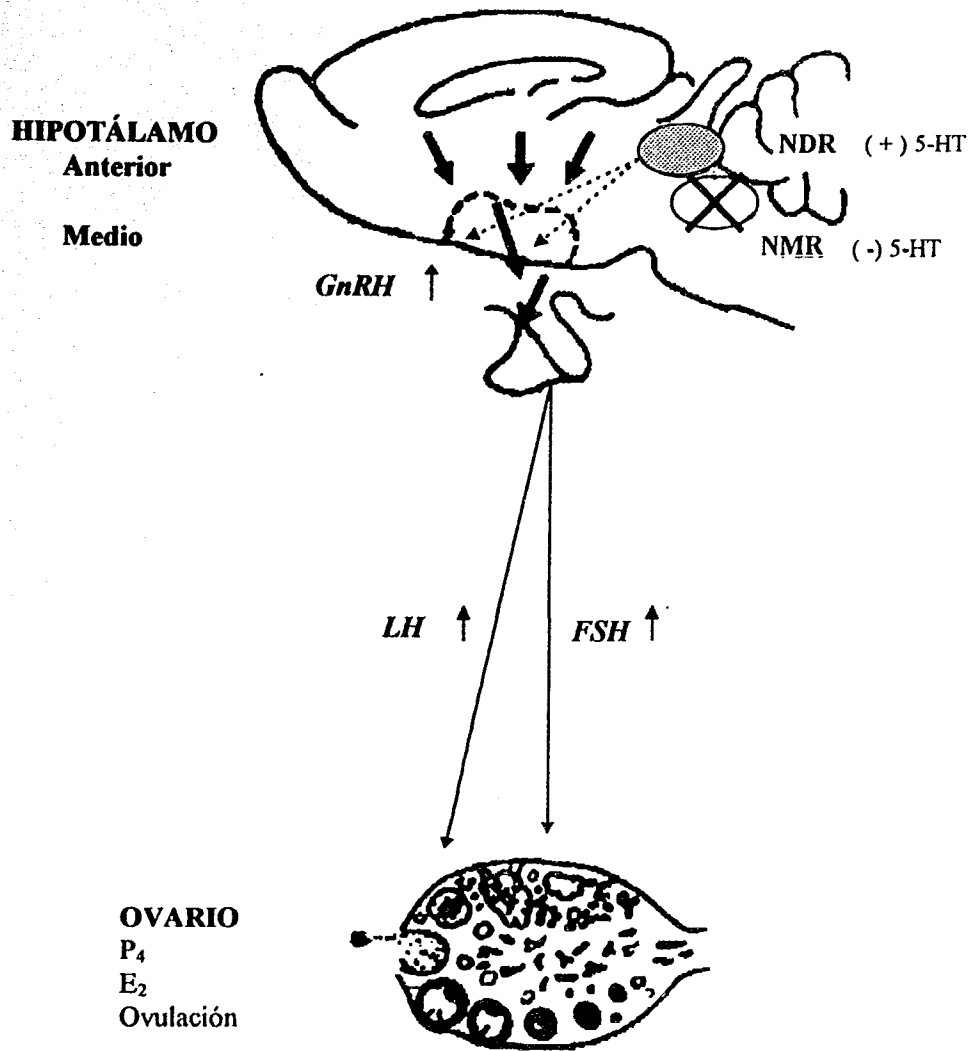


Figura 34. Modelo propuesto de la posible participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en el núcleo medial en el animal de 30 días de edad con lesión completa. El signo (+) indica efectos estimulantes, NDR (núcleo dorsal del raquídeo), NMR (núcleo medial del raquídeo), GnRH (hormona liberadora de las gonadotropinas), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona folículo estimulante), P₄ (progesterona), E₂ (estradiol).

CONCLUSIONES

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

- En el animal prepúber la inervación serotoninérgica del hipotálamo anterior y medio que se origina en el núcleo dorsal del rafe participa como modulador de los mecanismos neuroendócrinos que regulan el inicio de la pubertad.
- Este sistema de neurotransmisión que se origina en el núcleo dorsal, ejerce un efecto estimulante en la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y la primera ovulación.
- El sistema serotoninérgico que se origina en el núcleo medial del rafe, parece no participar o ejerce un efecto inhibitorio en el inicio de la pubertad y la primera ovulación.
- El sistema serotoninérgico del núcleo dorsal del rafe, envía una señal aferente al ovario, modulando así la reactividad del ovario a las gonadotropinas.
- Existe una comunicación entre el núcleo dorsal y medial del rafe que posiblemente este vinculada a la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la primera ovulación.

PERSPECTIVAS

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

- ¿Existe una distribución diferencial de las neuronas serotoninérgicas en el núcleo dorsal del rafé?
- ¿Existe una vía de comunicación neural entre el núcleo dorsal del rafé y la gónada, y si es así cuál(es) es (son) las vías?
- ¿Cuáles son los mecanismos que se modifican en el ovario por la falta de innervación del núcleo dorsal?
- ¿La innervación serotoninérgica del hipotálamo que es originada en el núcleo medial del rafé participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas? y si es así ¿es de tipo inhibitoria?
- ¿Existe una comunicación entre los núcleos dorsal y medial del rafé?
- ¿Existen dos sistemas serotoninérgicos separados anatómicamente que regulan la secreción de las gonadotropinas de forma inversa?

BIBLIOGRAFÍA

- Adams L.A., Steiner R.A.** (1988). Puberty. *Rev. Reprod. Biol.*, 10: 1-52.
- Advis J. P., Simlckins J.W., Chen H. T., Meites J.** (1978). Relation of biogenic amines to onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*, 103: 11-16.
- Advis J.P., Andrews W.W., Ojeda S.R.** (1979). Changes in ovarian steroidal and prostaglandin E responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*, 104: 653-658.
- Alves S.E., Weiland N.G., Hayashi S., McEwn B.S.** (1998). Immunocytochemical localization of nuclear estrogen receptors and progesterin receptors within the rat dorsal raphe nucleus. *J. Comp. Neurol.*, 391: 322-344.
- Arendash G.W., Gallo R.V.** (1979). Effect of lesions in the suprachiasmatic nucleus-retrochiasmatic area on the inhibition of pulsatile LH release induced by electrical stimulation on the midbrain dorsal raphe nucleus. *Neuroendocrinology*, 28: 349-357.
- Arias P.B., Szwarcfarb D.C., Carbone S.R., Sverlik R., Moguilevsky J.A.,** (1990). *In vivo* and *in vitro* studies on the effect of the serotonergic system on luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion in peripubertal female rats. *Brain Res.*, 523: 57-61.
- Ayala M.E., Rosas P., Domínguez R.** (1993). Effects of serotonergic blockade provoked at different ages on spontaneous and induced puberty in the female rat. *Med. Sci. Res.*, 21: 509-511.
- Ayala M.E., Rosas P., Domínguez R.** (1994). Different effects of unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation. *Brain Res. Bull.*, 34: 27-30.
- Ayala M.E., Monroy J., Morales L., Castro M.E., Domínguez R.** (1998). Effects of a lesion in the dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period of the female rat, on puberty. *Brain Res. Bull.*, 47: 211-218.
- Barofsky A.L.** (1975). Progesterone induced luteinizing hormone release in oestrogen-primed ovariectomized rats following destruction of midbrain input to the supraquiasmatic nuclei. *J. Encodrin.*, 66: 285-286.
- Barofsky A.L.** (1979). Median raphe simulation and sham procedures inhibit the LH surge. *Neuroendocrinology*, 28: 358-370.
- Baumgarten H.G.** (1972). Chemically induced degeneration in indoleamine-containing nerve terminals in rat brain. *Brain Res.*, 38: 228-232.

- Becún-Villalobos D., Lacau-Mengido I.M.** (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, 40: 1-17.
- Becún-Villalobos D., Libertun C.** (1986). Ontogenesis of [³H]serotonin binding sites in the hypothalamus of the female rat: Relation of serotonin-induced LH release in moxestrol-pretrated rat. *Dev. Brain Res.*, 25: 111-116
- Becún-Villalobos D., Lacau-Mengido I.M.** (1989). Developmental changes in FSH secretion induced by 5-hydroxytryptophan, naloxone and haloperidol in male and female rats. *Dev. Brain Res.*, 47: 181-186.
- Beigon A., Bercovits H., Samule D.** (1980). Serotonin receptor concentration during the estrous cycle of the rat. *Brain. Res.*, 187: 221-225.
- Beigon A., Fischette C.T., Bainbow R.C., McEwen B.S.** (1982). Serotonin receptor modulation by estrogen in discrete brain nuclei. *Neuroendocrinology*, 35: 287-291.
- Bendotti C., Servadio A., Forloni G., Angeretti N., Samanin R.** (1990). Increased tryptophan hydroxylase mRNA in raphe serotonergic neurons spared by 5,7-dihydroxytryptamine. *Mol. Brain Res.*, 8: 343-348.
- Bethea C.L.** (1993). Colocalization of progesterin receptors with serotonin in raphe neurons of macaque. *Neuroendocrinology*, 57: 1-6.
- Bethea C.L.** (1994). Regulation of progesterin receptors in raphe neurons of steroid-treated monkeys. *Neuroendocrinology*, 60: 50-61.
- Blandina P., Goldfard J., Walcott J., Green J.P.** (1991). Serotonergic modulation of the release of endogenous norepinephrine from rat hypothalamic slices. *J. Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 256: 341-347.
- Bockaert J., Fozard J.R.M., Dumuis A., Clarke D.E.** (1992). The 5-HT₄ receptor: a place in the sun. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13: 141-145.
- Bourgoin S., Artaud F., Adrien J., Hery F., Glowinski J., Hamon M.** (1977). 5-hydroxytryptamine catabolism in the rat brain during ontogenesis. *J. of Neurochem.*, 28: 415-422.
- Bousfiel R.G., Perry M.W., Ward D.N.** (1994). Gonadotropins, chemistry and biosynthesis. En: **The Physiology of Reproduction** second edition. (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 1749-1972.
- Breeser G.R., Cooper B.R., Grant L.D., Smith R.D.** (1974). Biochemical and behavioural alterations following 5,6-dihydroxytryptamine administration into brain. *Neuropharmacology*, 13: 177-187.

- Brodie A.M.H.** (1983). Biosynthesis, metabolism, and secretion of ovarian steroid hormones. En: **The Ovary**. (Edits) G.B. Serra. Raven Press, New York, 1-37
- Brown E.R.** (1994). Neurotransmitters. En: **An introduction to Neuroendocrinology**. Cambridge University Press, 40-87.
- Brow R.E.** (1966). The effect of reserpine, 5-hydroxytryptamine and other drugs on induced ovulation in immature mice. *J. Endocrinol*, 35: 161-168.
- Busby W.H., Quackenbush G.E., Humm J., Youngblood W.W., Kizer J.S.** (1987). An enzyme(s) that converts glutamyl peptides into pyroglutamylpeptides. *J. Biol. Chem.*, 262: 8532-8536.
- Carbone S., Szwarcfarb B., Otero M.E., Moguilevsky J.A.** (1992). Effects of ovarian steroids on the gonadotropin response to N-Methyl-D-Aspartate and on hypothalamic excitatory amino acid levels during sexual maturation on female rats. *Endocrinology*, 130: 1365-1370.
- Castro M.E.** (1999). Cambios en la maduración y crecimiento del folículo ovárico, secreción de gonadotropinas, esteroides ováricos y monoaminas hipotálamicas durante el desarrollo prepuberal de la rata. Tesis de Licenciatura. FES, Zaragoza UNAM.
- Chappel S.C., Ulloa-Aguirre A., Ramaley J.A.** (1983). Sexual maturation in female rats: time-related changes in the isoelectric focusing pattern of anterior pituitary follicle-stimulating hormone. *Biol. Reprod.*, 28: 196-205.
- Charli J-L., Ponce G., Joseph-Bravo P.** (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotálamicas. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. (Edit) R. Domínguez, UNAM-PORRUA, México, 59-85.
- Chávez R., Cruz Ma.E., Domínguez R.** (1987). Modifications on the ovarian response to gonadotropin induced ovulation in adult rats. *La Revista de Investigación Clínica*, 39: 149-153.
- Collu R.** (1978). Endocrine effects of brain serotonin depletion by 5,6-dihydroxytryptamine in prepubertal male rats. En: **Serotonin Neurotoxins**. (Edits) J. H. Jacoby y L.D. Lytle. Ann. New York Academy of Sci., 305: 411-422.
- Conn M.** (1994). The molecular mechanism of gonadotropin-releasing hormone action in the pituitary En: **The Physiology of Reproduction**. (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 1815-1832.
- Cruz Ma.E., Cháves R., Domínguez R.** (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *La Revista de Investigación Clínica*, 38: 167-171.

- Cruz Y., Martínez-Gómez M., Villalpando-Fierro T., Drummond H., Hudson R. (1998).** El MHC en la elección de la pareja ¿Realidad biológica o artefacto?. En: **Bases Neurobiológicas y Ecológicas de la Conducta.** (Edit) Martínez-Gómez M y Velázquez-Moctezuma, J., 91-116.
- Domínguez R., Chávez R., Cruz M.E. (1991).** La regulación del crecimiento y de desarrollo del folículo ovárico. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción.** (Edit) R. Domínguez. UNAM-PORRUA, México, 163-188.
- Domínguez-González A., Cháves R. (1993).** Asymmetric effects of unilateral lesions in the midbrain central gran matter on ovulation in the adult female rat. *Med. Sci. Res.*, 21: 513-514.
- Domínguez-González A., Cháves R. (1994).** Evidence for participation of the catecholaminergic system of the medbrain central gray matter on ovulation: a lateralised study. *Med. Sci. Res.*, 21: 513-514.
- Eckstein P. (1977).** Endocrine Activities of the Ovary 275-305. En: **The Ovary: Regulation of Oogenesis and Steroidogenesis.** (Edits) Lord Zuckerman y Barbara J. Weir. Academia Press, New York, I-II: 275-305.
- Fink G. (1988).** Gonadotrophin secretion and its control. En: **The Physiology of Reproduction.** (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 1349-1378.
- Flores A., Morales L., Ulloa-Aguirre A., Domínguez R. (1990).** Acute changes in serum levels of luteinising hormone and follicle stimulating hormone, ovulation and follicular growth induced by stress, unilateral ovariectomy or mechanical stimulation of the ovarian pedicle at different stages of the oestrous cycle of the rat. *Med. Sci. Res.*, 18: 819-821.
- Franschini F. (1970).** Role of indoleamines in the control of the secretion of pituitary gonadotropins. En: **Neurochemical Aspects of Hypothalamic Function.** Academic Press, Inc. New York, 141-159.
- Frazer A., Hensler, J. G. (1994).** Serotonin. En: **Basic Neurochemistry.** (Edits) George, J. Siegel, Bernard. W. Agronoff, R. Wayne Albers, Perry B. Molinoff. Raven Press New York, 238-319.
- Garza J.F., Díaz, V.S., Vásquez S.A., Brandeis A., Romero C. (1996).** El Radioinmunoanálisis y su Control de Calidad. Edits. F. Zambrano Achirica, V. Díaz Sánchez. México, 1-81.
- Gore-Langton R.E., Armstrong D.T. (1994).** Follicular steroidogenesis and its control. En: **The Physiology of Reproduction.** (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 571-611.

- Greenwald G.S., Roy S.K. (1994).** Follicular development and its control. En: **The Physiology of Reproduction.** (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 629-721.
- Héry M., Laplante E., Kordon C. (1978).** Participation of serotonin in the phasic release of LH. II. Effects of lesions of serotonin containing pathways in the central nervous system. *Endocrinology*, 102: 10109-1025.
- Hillier G.S. (1994).** Hormonal control of folliculogenesis and luteinization. En: **Molecular Biology of the Female Reproductive System.** (Edits) J.K. Findlay. Academic Press 1-25.
- Hishfield A.N., Migdley A.R. (1978).** Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 19: 597-605.
- Hsueh A.J., Billing H., Tsafiriri A. (1994).** Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Rev.*, 15: 707-723.
- Jacobs B.L., Azmitia E.C. (1992).** Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol. Rev.*, 72: 165-229.
- James M.D., Hole D.R., Wilson C.A. (1989).** Differential involvement of 5-hydroxytryptamine (5-HT) in specific hypothalamic areas in the mediation of steroid-induced changes in gonadotrophin release and sexual behaviour in female rats. *Neuroendocrinology*, 49: 561-569.
- Jennes D., Beckman W.C., Stumpf W.E., Grzanna R. (1982).** Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH systems in the septum and hypothalamus. *Exp. Brain Res.*, 46: 331-338.
- Jennes D., Stumpf W.E., Tappaz M. L. (1983).** Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic systems with the GnRH-systems in the septo-hypothalamic area. *Exp. Brain Res.*, 50: 91-99.
- Jhonson M.D., Crowley W.R. (1986).** Role of central serotonin systems in the stimulating effects of ovarian hormone and naloxone on luteinizing hormone release in female rats. *Endocrinology*, 118: 1180-1186.
- Justo S.N., Rossano G.L., Szwarcfarb R., Rubio M.C., Moguilevsky J.A. (1989).** Effect of serotonergic system of FSH secretion in male and female rats: Evidence for stimulatory and inhibitory actions. *Neuroendocrinology*, 50: 382-386.
- Kacsóh B., Toth B.E., Brosvenor C.E. (1993).** Neuroendocrine control of immunoreactive growth hormone and bioactive prolactin secretion in neonatal rats: ontogeny and interactions between the serotonergic, cholinergic and alpha2-adrenergic systems. *Neuroendocrinology*, 4: 176-180.

- Karki N., Kuntzman R., Brodic.** (1962). Storage, synthesis, and metabolism of monoamines in the developing brain. *J. of Neurochemistry*, 9: 55-58
- Kato** (1960). Serotonin content of rat brain in relation at sex and age. *J. of Neurochemistry*, 5: 202.
- Kerdelhué D., Bojda F., Lesieur P., Pasqualini C., El abed A., Lenoir V., Duillet P., Chiueh C.M., Palkovits M.** (1989). Medial eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology*, 49: 176-180.
- Kia H.K., Miquel M-C., McKernan R.M., Laporte A-M., Lombard M-C., Bourgoin S., Hamon M., Verge D.** (1995). Localization of 5-HT₃ receptor in the rat spinal cord: immunohistochemistry and in situ hybridization. *NeuroReport*, 6: 257-261.
- Kidd E.J., Laporte A.M., Langlois X., Fattaccini C.-M., Doyen C., Lombard M.C., Gozlan H., Hamon M.** (1993). 5-HT₃ receptors in the rat central nervous system are mainly located on nerve fibres and terminals. *Brain Res.*, 612: 289-298.
- King T.S., Steger R.W., Morgan W.W.** (1986). Effect of ovarian steroids to stimulate region-specific hypothalamic 5-hydroxytryptamine synthesis in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, 42: 344-350.
- Kiss J., Halász B.** (1985). Demonstration of serotonergic axons terminating on luteinizing hormone-releasing hormone neurons in the preoptic area of the rat using a combination of immunocytochemistry and high resolution autoradiography. *Neuroscience*, 14: 69-78.
- Kordon C., Drouvas S.V., Martínez de la E G., Weiner, R.I.** (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *The Physiology of Reproduction*. (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 1621-1681.
- Kordon C., Enjalvert A., Héry M., Joshep-Bravo P.I., Rotsztein W.I., Reberger M.** (1980). Role of neurotransmitters in the control of secretion. En: *Handbook of the Hypothalamus*. (Edits) P.J. Morge, J. Panksepp y M.D. ChKer, 253-286.
- Kordon C., Glowinski I.** (1972). Role of hypothalamic monoaminergic neurons in the gonadotrophin release-regulating mechanisms. *Neuropharmacology*, 11: 153-162.
- Kordon C., Javoy F., Vaseente Y., Glovinski J.** (1968). Blockade of superovulation in the immature rat by increased brain serotonin. *Eur. J. Pharmacol.*, 4: 169-174.
- Lidov H.G.W., Moller M.E.** (1982). Immunohistochemical study of the development of serotonergic neurons in the rat CNS. *Brain Res. Bull.*, 9: 559-604.

- Lindstrom P., Ohlsson L. (1987).** Effects of 5-hydroxytryptamine, dopamine and aromatic L-amino acids on growth hormone (GH) releasing-factor stimulated GH release in rat anterior pituitaries. *Endocrinology*, 120: 780-784.
- Luna L.G. (1975).** Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology. McGraw-Hill Book Co., New York, 21.
- Mena-Valdivia A., Nava E.E., Malacara H.M. (1995).** The opioid system and excitatory amino acids in the onset of puberty in female rats. *Arch. Med. Res.*, 26: 268-272.
- Meyer D.C. (1978).** Hypothalamic and raphe serotonergic systems in ovulation control. *Endocrinology*, 103: 1067-1074.
- Meyer D.C., Karavolas H.J., Klausung M., Norgard D.W. (1983).** Blood progesterone and pregnenolone levels during phenobarbital (PB) block of PMS-induced ovulation in immature rats. *Endocrinol.*, 88: 983-990.
- Moguilevsky J.A., Faigon M.R., Scacchi P., Szwarcfarb B. (1985).** Effect of serotonergic system on luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats. *Neuroendocrinology*, 40: 135-138.
- Moguilevsky J.A., Faigon M.R., Scacchi P., Szwarcfarb B. (1987).** Role of sexual differentiation of the hypothalamus in the differential effect of the serotonergic system on LH in prepubertal male and female rats. *Neuroendocrinology*, 52: 393-398.
- Moguilevsky J.A., Arias, P., Szwarcfarb B., Carbone, S., Rondina. D. (1990).** Sexual maturation modifies the catecholaminergic control of gonadotrophin secretion and the defect of ovarian hormones on hypothalamic neurotransmitters in female rats. *Neuroendocrinology*, 52: 393-398.
- Montagne M., Calas A. (1988).** Serotonin and endocrinology the pituitary. En: *Neuronal Serotonin*. (Edits) N.N. Osborne. M.Hamon. John Wiley & Sons, New York, 271-304.
- Montes G.S., Luque E.H. (1988).** Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat.*, 133: 192-199.
- Morales L., Chaves R., Domínguez R. (1993).** Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Med. Sci. Res.*, 21: 15-17.
- Morales L., (1996).** Participación del nervio ovárico superior en la regulación de la función del ovario de la rata prepúber. El modelo del animal estimulado con gonadotropinas y sus efectos sobre la ovulación y el crecimiento folicular. Tesis de Doctorado. Instituto de Neurobiología, UNAM.

- Morales L., Chavez R., Ayala ME., Domínguez R.** (1998). Effects of the unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats, on the ovulatory response to gonadotrophins administration. *J. Endocrinol.*, 158: 213-219.
- Morello H., Taleisnik S.** (1985). Changes of the release of luteinizing hormone (LH) on the day of proestrus after lesions or stimulation of the raphe nuclei in rats. *Brain Res.*, 360: 311-317.
- Morello H., Taleisnik S.** (1988). The inhibition of proestrous LH surge and ovulation in rats bearing lesions of the dorsal raphe nucleus in mediated by locus coeruleus. *Brain Res.*, 40: 227-231.
- Morello H., Caligaris L., Haymal B., Taleisnik S.** (1989). Inhibition of proestrous LH surge and ovulations in rats evoked by stimulation of the medial raphe nucleus involves a GABA-mediated mechanism. *Neuroendocrinology*, 50: 81-87.
- Morilak D.A., Ciaranello R.D.** (1993). Ontogeny of 5-hydroxytryptamine receptor immunoreactivity in the developing rat brain. *Neuroscience*, 55: 869-880.
- Müller E.E., Nisticó G.** (1988). Neurotransmitters neuromodulators, and neuromediators. En: **Brain Messengers and the Pituitary**. Academic Press. New York, 88-107.
- Ojeda S.R., Smith-White S., Aguado L.I.** (1983). Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: The rats as a model. *Neuroendocrinology*, 37: 306-313.
- Ojeda S.R., Urbanski H.F.** (1988). Puberty in the rat. En: **The Physiology of Reproduction**. (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 1699-1737.
- Ojeda S.R., Smith-White S., Advis J.P., Andrews W.W., Aguado L.I.** (1990). First preovulatory gonadotropin surge in the rodent. En: **Control of the Onset of Puberty**. (Edits) M.M. Grumbach, P.C. Sizonenko, M.L. Albes. Williams & Williams. USA, 156-182.
- Ojeda S.R., Urbanski H.F.** (1994). Puberty in the rat. En: **The Physiology of Reproduction**. (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 363-409.
- O'steen W.K.** (1964). Serotonin supression of luteinization in gonadotrophin-treated, immature rats. *Endocrinology*, 74: 885-888.
- O'steen W.K.** (1965). Supression of ovarian activity in immature rats by serotonin. *Endocrinology*, 77: 937-939.
- Parisi, M.N., Vitale M.L., Chioocchio S.R., Tranczzani J.H.** (1983). Serotonin levels in rat median eminence change during the estrous cycle. *Act. Physiol. Latioam.*, 133: 89-91.

- Paxinos G., Watson C. (1982).** The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. New York, USA.
- Pranzatelli M.R. (1992).** Serotonin receptor ontogeny: Effects of agonists in 1-day-old rats. *Pharm. Bioch. Behv.*, 43: 1273-1277.
- Penics-Thompson M., Brown N.A., Bethea C.L. (1998).** Regulation of serotonin re-uptake transported mRNA expression by ovarian steroids in rhesus macaques. *Mol. Brain Res.*, 53: 120-129.
- Penics-Thompson M., Brown N.A., Kohama S.G., Bethea C.L. (1996).** Ovarian steroid regulation of tryptophan hydroxylase mRNA expression in rhesus macaques. *J. Neuroscience*, 16: 7021-7029.
- Pedernera E. (1993).** Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: **Comunicación Neuroendócrina. Bases Celulares y Moleculares.** (Edits) C. Clap y G. Martínez de la E. SMCF, Conacyt, SEP. México, 33-46.
- Ramaley J.A. (1979).** Development of gonadotropin regulation in the pubertal mammal. *Biol. of Reprod.*, 20: 1-31.
- Rance N., Wise P.M., Selmonoff M.K., Barraclugh C.A. (1981).** Catecholamines turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrus day 1. *Endocrinology*, 108: 1795-1802.
- Richards J.S. (1980).** Hormonal control of follicular growth and maturation in mammals. En: **The Vertebrate Ovary. Comparative Biology.** (Edits) R.E. Jones. Plenum Press, New York, 331-360.
- Saland L.C., Wallace J.A., Comunas F. (1986).** Serotonin-immunoreactive nerve fibers of the rat pituitary: effects of anticatecholamines and antiserotonin drugs on staining patterns. *Brain Res.*, 368: 310-318.
- Salve M.L., Amich S., Prieto S., Casas A. (1994).** *Laboratorio Clínico, Bioquímica.* Mc Graw-Hill, p. 496.
- Sanders-Bush E., Bushing J.A., Sulser F. (1972).** Long-term effects of p-cloroamphetamine on tryptophan hydroxylase activity on the levels of 5-hydroxyindoleacetic acid in brain. *Eur. J. of Pharmacol.*, 20: 385-388.
- Sanders-Bush E., Massari V.J. (1977).** Actions of drugs that deplete serotonin. *Fed. Proc.*, 36: 2149-2153.

- Saper C.B.** (1994). Central autonomic system. En: **The Rat Nervous System**. (Edits) Paxinos, G. Academic Press, New York, 107-135.
- Shannon N.J., Gunnet J.W., Moore K.E.** (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neural activity following electrical stimulation of the raphe nucleus. *J. Neuroch.*, 47: 959-965.
- Sherwood N.M., Timiras P.S.** (1970). A stereotaxic atlas of the developing rat brain. University of California Press. New York, USA, 1283-1304.
- Silverman A.J., Livne I., Witki J.W.** (1994). The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization. En: **The Rat Nervous System**. (Edits) Paxinos, G. Academic Press, New York, 1683-1710.
- Simerly B.R.** (1995). Anatomical substrates of hypothalamic integration. En: **The Rat Nervous System**. (Edits) Paxinos, G. Academic Press, New York, 353-390.
- Smith E.R., Jhonson J., Weick R.F., Levine S., Davison J.M.** (1971). Inhibition of the reproductive system in immature rats by intracerebral implantation of cortisol. *Neuroendocrinology*, 8: 94-106.
- Soghomonian J.J., Beradet A., Descarries L.** (1988). Ultrastructural relationships of central serotonin neurons. En: **Neuronal Serotonin**. (Edits) N.N. Osborne y M.Hamon. John Wiley & Sons, New York, 57-92.
- Stratford, T. R., Wirtshafter, D.** (1990). Ascending dopaminergic projections from the dorsal nucleus in the rat. *Brain Res.*, 511: 173-176.
- Steinetz B.G.** (1978). Secretion and function of ovarian estrogens. En: **Handbook of Physiology**. (Edits) R.O. Greep y E. Astwood. American Physiological Society, Washington, 439-466.
- Takeuchi Y.** (1988). Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. En: **Neuronal Serotonin**. (Edits) N.N. Osborne. M.Hamon. John Wiley & Sons, New York, 25-26.
- 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. *Revista de Investigación Clínica*, 36: 179-192.
- Ulloa-Aguirre A.** (1991). Aspectos bioquímicos-funcionales de la hormona estimulante del foliculo. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. (Edit) R. Dominguez, UNAM-PORRUA, México, 83-103.
- Ulloa-Aguirre A., Mejia J.J., Domínguez R., Guevara-Aguirre J., Díaz-Sánchez V., Larrea F.** (1986). Microheterogeneity of anterior pituitary FSH in the male rat: isoelectric focusing pattern throughout sexual maturation. *J. Endocrinol.*, 110: 539-549.

- Ulloa-Aguirre A., Espinosa R., Damian-Matsumura P., Chappel S.C. (1988).** Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. *Human Reprod.*, 3: 491-501.
- VanderHorst V.G.J.M., Schasfoort F.C., Meijer E., Van Leeuwen F.W., Holstege G. (1998).** Estrogen receptor-alpha-immunoreactive neurons in the periaqueductal gray of the adult ovariectomized female cat. *Neuroscience Letters*, 240: 13-16.
- Van de Kar L.D., Lorens S.A. (1979).** Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and medial midbrain raphe nuclei. *Brain Res.*, 162: 45-54.
- Van de Kar L.D., Lorens S.A., Vodraska A., Allen G., Green M., Van Orden D.E., Van Orden L.S. (1980).** Effect of selective midbrain and diencephalic 5,7-dihydroxytryptamine lesions on serotonin content in individual preoptico hypothalamic nuclei and on serum luteinizing hormone level. *Neuroendocrinology*, 31: 309-315.
- Villar, J. M., Chiochio, S. R., Tramezan, J. A. (1984).** Origin and termination of dorsal raphe-median eminence projection. *Brain Res.*, 324: 165-170.
- 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 M.L., Villar M.J., Chiochio S.R., Tramezzani J.H. (1987).** Dorsal raphe lesion alters the estrous cycle and the preovulatory gonadotropin release. *Neuroendocrinology*, 46: 252-257.
- Vitale M.L., Chiochio S.R. (1993).** Serotonin, a neurotransmitter involved in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocrinol. Rev.*, 14: 480-493.
- Wallace J.A., Lauder J.M. (1983).** Development of the serotonergic system in the rat embryo: An immunocytochemical study. *Brain Res. Bull.*, 10: 459-479.
- Watts A.G., Stanley H.F. (1984).** Indoleamines in the hypothalamus and area of the midbrain raphe nuclei of male and female rats throughout postnatal development. *Neuroendocrinology*, 38: 461-466.
- Weiner N., Molinoff P.B. (1994).** Catecholamines. En: *Basic Neurochemistry*. (Edits). George, J. Siegel, Bernard. W. Agronoff, R. Wayne Albers, Perry B. Molinoff. Raven Press New York., 261-282.
- Westlud D.M., Childs G.V. (1982).** Localization of serotonin fibers in the adenohypophysis. *Endocrinol.*, 111: 1761-1763.

- Wilkinson M., Bhanot R. (1982).** A puberty-related attenuation of opiate peptide-induced inhibition of LH secretion. *Endocrinol.*, 110: 1046-1048.
- Wilson C.A., McDonal P.G. (1974).** Inhibitory effect of serotonin on ovulation in adult rats, *J. Endocrinology*, 60: 253-260.
- Wilson C.A., Andrews, M., Hadley J.C., Lemon M., Yeo M.T. (1977).** The role of hypothalamic serotonin (5-HT) before ovulation immature rats treated with PMS. *Psychoneuroendocrinology*, 2: 267-274.
- Wilson C.A., McNeilly A.S., Yeo M.T. (1986).** Mechanisms by which 5-HT stimulates ovulation in the immature rat treated with pregnant mare serum gonadotrophin. *Acta Endocrinologica*, 111: 235-240
- Zeleznik A.J., Fairchild-Benyo D. (1994).** Control of follicular development, corpus luteum function, and the recognition of pregnancy in higher primates. En: **The Physiology of Reproduction.** (Edits) E. Knobil y J. D. Neill. Raven Press. New York, USA, 751-782.

APÉNDICE

Apéndice A

Disección de las diferentes regiones del cerebro

El cerebro se extrajo y se colocó en solución salina fría (0°C) e inmediatamente después se congeló con nitrógeno líquido. En la disección del hipotálamo anterior se consideró como límite rostral el quiasma óptico y la comisura anterior, lateralmente por los surcos hipotalámicos laterales y caudalmente por área retroquiasmática y el tracto mamilotalámico. El hipotálamo medio se delimitó rostralmente por el tracto mamilotalámico y por el fornix, lateralmente por los surcos hipotalámicos y caudalmente por los cuerpos mamilares. En el hipotálamo posterior se consideró como límite rostral los cuerpos mamilares, lateralmente los surcos hipotalámicos y caudalmente por la fosa interpeduncular y el área tegmental ventral. La profundidad del corte para la disección de cada una de las regiones del hipotálamo fue de 3 mm aproximadamente (Figura 35).

Para la región del núcleo dorsal y medial del rafe se consideraron como límite anterior el lóbulo pituitario, el núcleo pontine y el tronco piramidal, lateralmente la sustancia gris periacueductal y como límite posterior el núcleo del puente del rafe y el subpedúnculo cerebral de acuerdo a el atlas de Paxinos y Watson (1982). El núcleo dorsal fue obtenido mediante un sacabocado de 2 mm de diámetro y el núcleo medial del rafe se obtuvo al realizar un corte dorsal en la región de la decusación cerebelar peduncular y un corte ventral en el área del núcleo reticulotegmental y lateralmente al tracto tectoespinal (Figura 35).

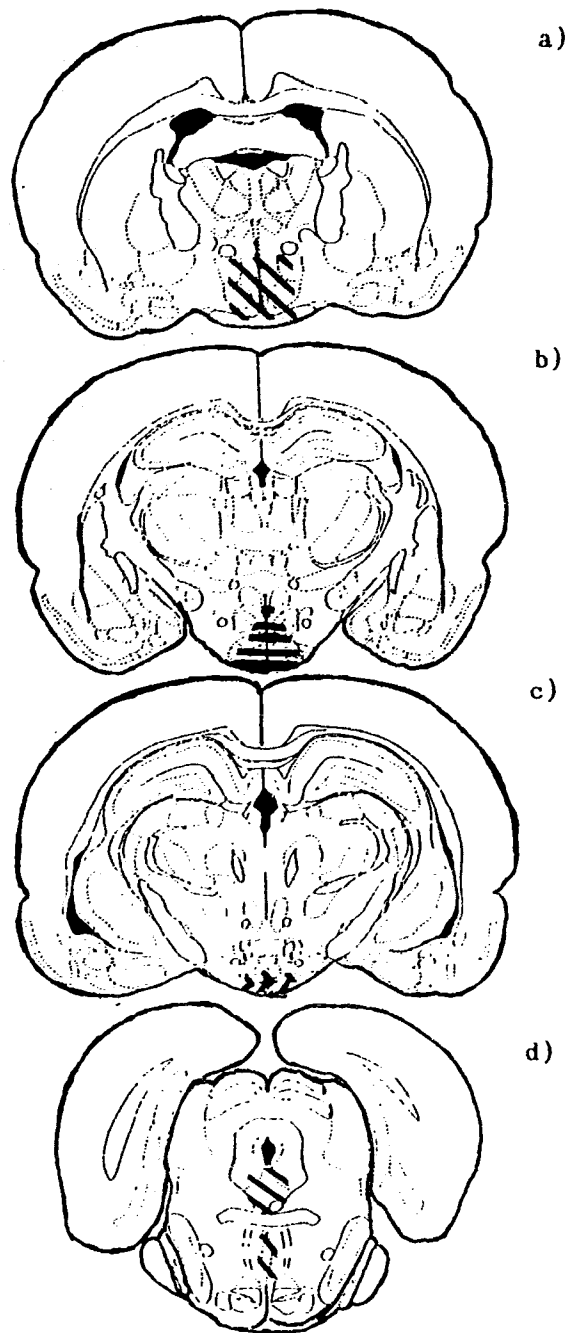


Figura 35. Esquema de cortes coronales del cerebro de la rata en el que se muestra la localización del hipotálamo anterior (a), hipotálamo medio (b), hipotálamo posterior (c) y núcleo dorsal y medial del rafé (d) (Tomado de Paxinos y Watson (1982)).

Apéndice B

Preparación de muestras para la cuantificación de neurotransmisores

El tejido cerebral de hipotálamo anterior, medio o posterior fueron pesadas en balanza de precisión y se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 ml y se suspendieron en 300 μ l de ácido perclórico (HClO_4 al 0.1N), posteriormente fueron homogeneizados por sonicación en frío durante 5 segundos y centrifugado a 12,500 rpm. a -4°C por 30 minutos. El sobrenadante se filtró con filtros de celulosa de tamaño de poro de 0.2 μ m y se inyectaron 20 μ l del extracto en el sistema de cromatografía de líquidos. El tejido del núcleo dorsal y medial del rafe fueron pesados por separado y colocados en tubos eppendorf de 0.5 ml y se les adicionó 150 μ l de HClO_4 y se siguió el mismo procedimiento que en el tejido hipotalámico.

Sistema de Cromatografía de Líquidos

El equipo de HPLC está constituido de una bomba isocrática digital (modelo L-250 Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA), una válvula de inyección Rheodyne (modelo 7125, Perkin Elmer Co., Norwalk, USA) con una capacidad de veinte μ l y una columna de fase reversa C-18 (25 cm X 4.6 mm, con partícula de 10 μ m de diámetro, Bioanalytical Systems, West Lafayette, In USA). La columna se encuentra acoplada a un detector electroquímico (modelo L4-C4, BAS West Lafayette, In USA) (conformado de un electrodo de trabajo de carbón vidriado y un electrodo de referencia de plata/cloruro (Ag/AgCl)). Los datos obtenidos fueron procesados por un integrador (modelo 1020, Perkin Elmer).

La fase móvil consistió de un buffer de citratos 0.1 M pH=3.0 (citrato de sodio, Merk-México) más 100 mg de ácido octanosulfónico (Merk-México). Dicha solución se filtro a través de una membrana de celulosa (poro de 0.22 μ m, Millipore Bedford, MA, USA) y degasificada con helio a vacío. Inmediatamente después se adicionó 20 ml de acetonitrilo (OmniSolve, EM Science, Canadá) y 15 ml de tetrahidrofurano (OmniSolve, EM Science, Canadá), el volumen final fue de 500 ml. La fase fue bombeada al sistema de cromatografía a un flujo de 1.2 ml/min.

Preparación de estándares

En el día de trabajo se prepararon estándares de los siguientes neurotransmisores y sus principales metabolitos: noradrenalina (NA) [(-)-Arterenol fase libre], 4-hidroxi-3-metoxifenil glicol (MHPG), dopamina (DA), [3-hidroxi tiramina hidroclicorada], 3-4-dihidroxifenilacético-ácido (DOPAC), serotonina (5-HT) [5-hidroxitriptamina] y el ácido 5-hidroxiindole-3-acético (5-HIAA) (Sigma Chemical, Co., St. Louis. Mo, USA).

Solución A: se preparó una solución de 1 mg/2 ml de ácido perclórico 0.1N de cada uno de los neurotransmisores y su metabolito y fueron almacenados a -70°C .

Solución B: se adicionaron 50 μl de cada uno de los neurotransmisores y su metabolito en un matraz ámbar y se aforó a 10 ml con HClO_4 al 0.1N.

Solución C: se tomaron 50 μl de la solución B y se adicionó a un tubo ependorff que contenía 1200 μl de HClO_4 (estándar de 2 ng).

Solución D: se tomaron 500 μl de solución C y se agregaron 500 μl de HClO_4 (estándar de 1 ng).

Solución E: se tomaron 500 μl de solución D y se adicionó 500 μl de HClO_4 (estándar de 0.5 ng).

Solución F: se tomaron 100 μl de solución D y se diluyó en 900 μl de HClO_4 (estándar de 0.1 ng).

La calibración se realizó con el método de estándar externo, se utilizó empleando el área de los picos obtenidos en el cromatograma de tres concentraciones diferentes de estándares (1, 0.5 y 0.1 ng) y se ajustaron a una curva lineal, que incluye el origen, por el método de regresión de mínimos cuadrados. Los valores de correlación obtenidos para cada uno de los estándares fueron mayor o igual a 0.95. El integrador 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, el límite de detección de los diferentes neurotransmisores fue de 0.01 ng.

Apéndice C

Hormonas esteroides

La cuantificación de progesterona y 17β -estradiol se realizó por radioinmunoanálisis, para lo cual se utilizó un estuche comercial de la marca Coat-A-Count, que consiste de tubos de polipropileno impregnados con anticuerpos de coneja, viales de hormona marcada (^{125}I Progesterona y ^{125}I Estradiol y 7 calibradores con diferente concentración para realizar la curva patrón.

Preparación de muestras

Se tomaron 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 conteo. En el caso de la cuantificación de testosterona se tomaron 50 μl de suero y se realizó el procedimiento mencionado anteriormente.

Preparación de la curva patrón de la progesterona y del 17β -estradiol

Progesterona

- La curva patrón se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores de 0.1, 0.5, 2.0, 10, 20 y 40 ng/ml
- Unión máxima: contiene anticuerpo más 1000 μl de hormona marcada.
- Cuentas totales: contiene 1000 μl de hormona marcada.

Estradiol

- La curva patrón se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores de 0.0, 20, 50, 150, 500, 1800 y 3600 pg/ml y se realizaron diluciones para obtener estándares de 0.0, 5.0, 10, 20, 50, 75, 150 y 250 pg/ml
- Unión máxima: contiene anticuerpo más 1000 μl de hormona marcada.
- Cuentas totales: contiene 1000 μl de hormona marcada.

Hormona proteica

Preparación de muestras

A 100 µl de suero, se le adicionaron 100 µl de anticuerpo de suero de borrego para LH (rLH-RP2) y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se agregaron 100 µl del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubaron durante 2 horas, posteriormente los tubos se centrifugaron a 3000 rpm. a -4°C por 30 min., finalmente el sobrenadante se decantó, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en un contador de centelleo para su análisis.

Preparación de la curva patrón

- La curva patrón se realiza por duplicado y se utilizaron estándares LH de 0.0, 0.4, 0.8, 1.6, 3.1, 6.25, 12.5 y 50 ng.
- Unión máxima: contiene anticuerpo más 1000 µl de hormona marcada.
- Cuentas totales: contiene 1000 µl de hormona marcada.

Esta tesis se basa en los siguientes trabajos presentados en congresos nacionales e internacionales.

1. EFECTOS DE LA INYECCIÓN DE 5,6-DIHIIDROXITRIPTAMINA EN EL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ SOBRE LA EDAD DE LA PUBERTAD Y LA PRIMERA OVULACIÓN DE LA RATA.

J. Monroy, ME. Ayala, ME. Castro, R. Chavira, R. Domínguez

XXIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, 1998.

2. EFFECTS OF THE MICOINJECTION OF 5,6-DIHYDROXYTRYPTAMINE (5,6-DHT) INTO THE MEDIAL RAPHE NUCLEUS (MRN) ON PUBERTY AND FIRST OVULATION IN THE FEMALE RATA.

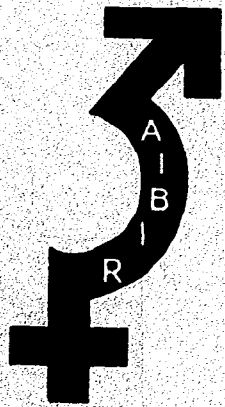
J. Monroy, ME. Castro, ME. Ayala, R. Chavira, R. Domínguez.

28th Annual Meeting, Society for Neuroscience; 144.1; 1998

3. EFFECTS OF THE INJECTION OF 5,6-DIHYDROXYTRYPTAMINE (5,6-DHT) INTO THE DORSAL (DRN) OR MEDIAL (MRN) RAPHE NUCLEUS ON FIRST OVULATION.

J. Monroy, ME. Castro, ME. Ayala, R. Domínguez

32nd Annual Meeting, Society for the Study of Reproduction; 512; 1999.



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

XXIII REUNION ANUAL
Cuernavaca, Morelos

EFFECTOS DE LA INYECCIÓN DE 5,6-DIHIIDROXITRIPTAMINA EN EL NÚCLEO DORSAL DEL RAFÉ SOBRE LA EDAD DE LA PUBERTAD Y LA PRIMERA OVULACIÓN DE LA RATA.

J. Monroy¹, ME. Ayala¹, ME Castro¹, R.Chavira² y R. Domínguez¹

¹Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. (Laboratorio de Pubertad). FES Zaragoza, UNAM. ²Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (Laboratorio de hormonas esteroides).

La pubertad se define como la etapa biológica del individuo en la que se presenta una serie de eventos neuroendócrinos y fenotípicos que enlazan la inmadurez y la madurez sexual (Becún-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski 1994). Dichos cambios están regulados por las hormonas ováricas (andrógenos, estrógenos, progesterona e inhibina), por las gonadotropinas [hormona foliculoestimulante (FSH), luteinizante (LH) y prolactina (PRL)]. La secreción de la FSH y la LH es regulada por un decapeptido secretado por el hipotálamo, la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) (Ojeda y Urbanski 1994).

Diversas evidencias experimentales muestran que en la regulación de la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas participan los esteroides gonadales y varios sistemas de neurotransmisión como el catecolaminérgico y el serotoninérgico de origen intra y extrahipotalámicos (Kordon y col., 1994).

Estudios morfológicos han mostrado que la fuente principal de serotonina en el hipotálamo, se origina en los núcleos dorsal y medial de rafé (Takeuchi 1988; Van de Kar y Lorens 1979; Villar y col., 1984) y que existe una comunicación sináptica entre la terminal nerviosa de la fibra serotoninérgica y el soma de la neurona GnRHérgica, en área hipotalámica anterior y en la eminencia media una interacción entre las terminales nerviosas de dichas neuronas (Jennes y col., 1983). Con base en estas evidencias y en otros resultados experimentales se sugiere que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal y medial de rafé participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de la GnRH, de las gonadotropinas y la ovulación (Ayala 1995; Montagne y Calas 1988; Meyer 1978, Morello y col., 1989; Vitale y Chiochio 1993; Vitale y col., 1987).

En la rata hembra adulta, la lesión del núcleo dorsal del rafé en la tarde del proestro, bloquea la ovulación y disminuye la concentración de la LH, mientras que la estimulación eléctrica de este núcleo no produce cambios en dichos eventos (Morello y Taleisnik, 1985). En la rata prepúber, la lesión química del núcleo dorsal o medial inducida por la inyección local de 5,7-dihidroxitriptamina (neurotóxico de las fibras serotoninérgica), bloquea la ovulación inducida por la gonadotropina de suero de yegüa preñada (PMSG) y disminuye la recaptura de la serotonina en la eminencia media y en el núcleo arcuato. Sin embargo, los efectos son más evidentes cuando la lesión se efectúa en el núcleo dorsal (Meyer, 1978). Estos resultados permiten pensar que estos núcleos estimulan la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.

Apoiado por DGAPA, contrato IN 208796 y PUIS, UNAM.

La lesión térmica del núcleo dorsal en la rata de 30 días de edad impide la ovulación en el día del primer estro vaginal y disminuye la concentración de serotonina en el hipotálamo completo. Estos resultados permitieron plantear que la inervación serotoninérgica que se originan en el núcleo dorsal del rafé participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la primera ovulación (Ayala, 1995).

También se ha mostrado que la inervación serotoninérgica que se origina en este núcleo inerva de manera diferencial el hipotálamo anterior, medio y posterior (Van de Kar y Lorens 1979; Van de Kar y col., 1980) y que el núcleo dorsal del rafé no contiene exclusivamente somas serotoninérgicos (Strantford y Witshafter 1990), por lo que la lesión térmica no es muy selectiva para las neuronas productoras de la amina.

Por ello, en el presente trabajo se decidió analizar los efectos de la lesión química del núcleo dorsal del rafé inducida por la microinyección de la 5,6-dihidroxitriptamina (5,6-DHT, neurotóxico selectivo de las neuronas serotoninérgicas) en el inicio de la pubertad y la primera ovulación, así como en los cambios en la concentración de serotonina y en la actividad de este sistema de neurotransmisión en el hipotálamo anterior, medio y posterior.

MATERIAL Y MÉTODO

Se utilizaron ratas hembras de 30 días de edad, de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de iluminación, 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días) y posteriormente a el agua y al alimento hasta el sacrificio, a todos los animales de los diferentes grupos experimentales se les registro el día de la apertura vaginal, momento en el cual se inicio la toma de frotis vaginales diarios, que posteriormente se tiñeron con hematoxilina-eoxina. Todos los animales fueron sacrificados en la mañana del día del primer estro vaginal.

Procedimiento de lesión

Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (anestésal, Smit Kline Norden de México, México) (40 mg/kg peso) por vía intraperitoneal (i.p.) seguido de anestesia complementaria con éter; fueron montados en un aparato estereotáxico, se seccionó la piel, se perforó el cráneo con una fresa odontológica y se introdujo una aguja de 22x13 mm (conectada a una jeringa Hamilton de 100 μ l, acoplada a una bomba de microdiálisis (MCA/100 Bionalytical Systems, USA). Las coordenadas para introducir la aguja de microinyección hasta el sitio de estudio, se calcularon tomando como referencia el atlas del animal prepúber de Sherwood y Timiras (1970): anteroposterior (AP) 0.7 mm; lateral (L) 3.3 mm con una inclinación de 30° perpendicular a la línea media y ventromedial (V) 6.4 mm. Para realizar la lesión del núcleo dorsal del rafé, se inyectaron 10 μ g de 5,6-Dihidroxitriptamina (5,6-DHT Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) en un volumen de 2.5 de ácido ascórbico (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, USA) al 0.05% en solución salina (pH 3.5).

Operación simulada. Ratas a las que se inyectó 2.5 µl de ácido ascórbico disuelto en solución salina.

Grupo testigo absoluto. Animales sin tratamiento

Procedimiento de autopsia.

Los animales se pesaron e inmediatamente se sacrificaron por decapitación. A la autopsia se disecaron y pesaron los ovarios y el útero, en balanza de precisión. Las trompas uterinas se revisaron y se contó el número de ovocitos liberados cuando estuvieron presentes con la ayuda del microscopio estereoscópico. El peso de los órganos fue expresado en miligramos (mg), se extrajo el cerebro, el cual se colocó en solución salina fría (0°C) y se congeló con nitrógeno líquido. Se disecó el hipotálamo y se efectuaron cortes coronales para separar el hipotálamo anterior, el hipotálamo medio y el hipotálamo posterior. En la disección del hipotálamo se consideró como límite rostral, el quiasma óptico y la comisura anterior, lateralmente los surcos hipotalámicos laterales y caudalmente por los cuerpos mamilares (Paxinos y Watson 1982). Las muestras se almacenaron a -70 °C hasta la posterior cuantificación de serotonina (5-HT) y del ácido 5-hidroxiindolacético (5-HIAA) por Cromatografía de Líquidos de Alta Precisión (HPLC). Se colectó la sangre del tronco y se dejó coagular por 30 minutos, se centrifugó por 15 minutos a 3500 rpm y se extrajo el suero, el cual se almacena a -20°C hasta la cuantificación de 17-βestradiol y progesterona.

Cuantificación de serotonina

La concentración de serotonina y su metabolito se cuantificó siguiendo la metodología descrita (Ayala y col., 1998). Las muestras se pesaron y homogenizaron en 1000 µl de ácido perclórico 0.1N, se centrifugaron a 12,000 g a -4°C por 30 minutos, el sobrenadante se filtró en filtros de celulosa de 0.2 µm y se inyectó veinte microlitros del extracto en el sistema de cromatografía de líquidos.

La concentración del neurotransmisor y su metabolito fue expresado en nanogramos por miligramo de tejido. La actividad de la neurona serotoninérgica se calculó con la relación descrita por Kerdelhue y col., (1989) y Shanon y col., (1986).

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

Cuantificación de estradiol y progesterona

La cuantificación de 17-βestradiol y progesterona se realizó por la técnica de radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, con un kit Coat-A-Count. La concentración de estradiol fue expresada en picogramos por mililitro (pg/ml) y la de progesterona en nanogramos por mililitro (ng/ml).

Análisis del sitio de lesión

Para la localización de la trayectoria de la aguja en los animales con operación simulada o del sitio de lesión inducido por la microinyección de la 5,6-DHT, el cerebro de los animales se fijó en formol al 10 % durante 24 h y posteriormente se realizaron cortes coronales (de la región frontal a la caudal) a 120 μm en el criostato, los que se tiñeron con violeta de cresílo (Luna 1975).

Análisis estadístico

Los resultados del peso corporal y del útero, la concentración de serotonina, su metabolito y la actividad de la neurona serotoninérgica fueron analizados por la prueba de varianza múltiple (ANDEVA) seguida por la prueba de "t" de Student. Las edades de la apertura vaginal y del primer estro vaginal y el número de ovocitos por la prueba de "U" de Mann-Whitney. La tasa de animales ovulantes fue evaluada por la prueba de Ji-Cuadrada, se consideraron como significativas aquellas diferencias en las cuales la probabilidad fue igual o menor al 5%.

RESULTADOS

La ubicación de lesión producida por la microinyección de la 5,6-DHT, permitió dividir a los animales en dos grupos: aquellos en los que la lesión del núcleo dorsal del rafé fue parcial y abarcó parte de la región gris periacueductal y otro grupo en los que la lesión abarcó completamente el núcleo dorsal del rafé (Figs. 1 y 2).

En comparación al grupo testigo absoluto, en los animales con operación simulada no se observaron modificaciones en la edad de la apertura vaginal, pero sí un retraso significativo en la edad del primer estro vaginal, lo cual se acompañó del incremento significativo del peso corporal y del útero (peso corporal: 125 ± 1.9 vs. 112 ± 2.9 ; peso del útero: 192 ± 5.7 vs. 157 ± 5.8 ; $p < 0.05$). No se observaron diferencias significativas en el peso de los ovarios (38.4 ± 1.2 vs. 35.6 ± 1.4).

En los animales con lesión parcial o completa del núcleo dorsal del rafé, la edad de la canalización y primer estro vaginal fueron similares a las observadas en el grupo de ratas con operación simulada. La proporción de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados por las ratas con lesión parcial del núcleo fueron similares a los animales con operación falsa y testigos absolutos. En los animales del grupo con lesión completa, sólo se presentó la ovulación espontánea en el 53 % de los animales y en aquellos animales que ovularon, el número de ovocitos liberados fue significativamente menor que en todos los demás grupos (Tabla 1).

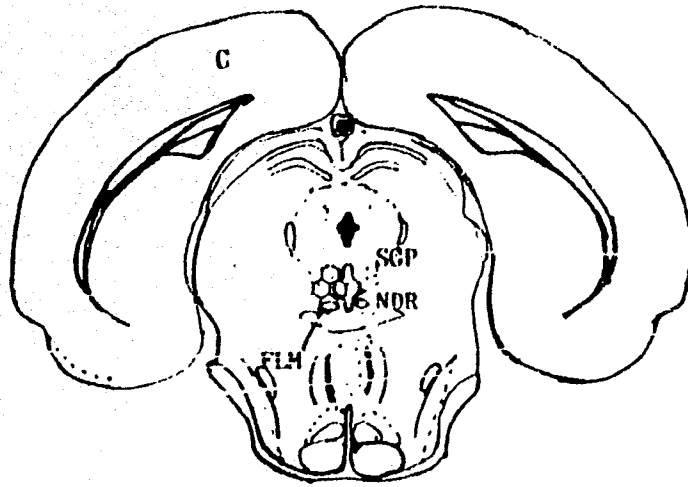


Figura 1. Representación esquemática de la lesión parcial del núcleo dorsal del rafe en un corte coronal. El área sombreada representa la lesión. C: corteza, SGP: sustancia gris periacueductal; FLM: fascículo longitudinal medial; NDR: núcleo dorsal del rafe (tomado del atlas de Sherwood y Timiras 1970).

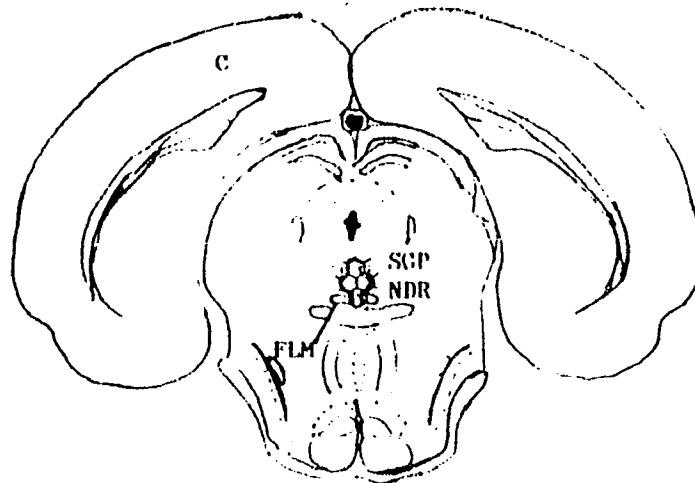


Figura 2. Representación esquemática de la lesión completa del núcleo dorsal del rafe en un corte coronal. El área sombreada representa la lesión. C: corteza, SGP: sustancia gris periacueductal; FLM: fascículo longitudinal medial; NDR: núcleo dorsal del rafe (tomado del atlas de Sherwood y Timiras 1970).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. de las edades de la apertura vaginal (EAV) y del primer estro (EPE), del número de ovocitos liberados por animal ovulante y la tasa de animales ovulantes de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS) o con lesión parcial o completa del núcleo dorsal del rafé, inducida por la administración de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

GRUPO	n	EAV	EPE	TASA DE ANIMALES OVULANTES	NÚMERO DE OVOCITOS
TA	27	40.2 \pm 0.5	40.6 \pm 0.5	20/27	8.5 \pm 0.5
OS	10	42.2 \pm 0.9	43.3 \pm 0.7*	9/10	9.1 \pm 0.7
Lesión parcial	10	43.5 \pm 0.8*	44.7 \pm 1.1*	10/10	10.3 \pm 0.5
Lesión completa					
Ovulantes	9	43.3 \pm 1.2*	43.9 \pm 0.9*	9/17	6.2 \pm 0.9***
No ovulantes	8	44.8 \pm 1.3*	47.4 \pm 1.7*		

* p<0.05 vs. grupo TA (Prueba de "U" de Mann-Whitney)

* p<0.05 vs. grupo OS (Prueba de "U" de Mann-Whitney)

* p<0.05 vs. grupo LF (Prueba de "U" de Mann-Whitney).

El peso de los ovarios de los animales con lesión parcial o con lesión completa que ovularon y no ovularon fue similar a los del grupo con operación simulada (39.1 \pm 1.9; 33.3 \pm 2.2; 31.9 \pm 3.9 vs. 38.4 \pm 1.2, respectivamente). El peso del útero de los animales con lesión parcial o con lesión completa que ovularon fue significativamente menor que el de los animales con operación falsa (168 \pm 4.5; 168 \pm 7.5 vs. 192 \pm 5.7, p<0.05). En los animales con lesión completa que ovularon, el peso del útero fue significativamente mayor que en los que no ovularon (213 \pm 14.2 vs. 168 \pm 7.5, p<0.05).

Las concentraciones de progesterona y 17 β -estradiol en el suero de los animales con operación simulada fue similar a la del grupo testigo. En los animales con lesión parcial del rafé dorsal no se modificaron estos parámetros, mientras que en los animales con lesión completa que ovularon la concentración de 17 β -estradiol fue significativamente mayor que la del grupo con operación falsa, mientras que en los animales que no ovularon no se observaron diferencias significativas respecto a los demás grupos experimentales. En comparación con el grupo testigo absoluto, la concentración de la progesterona aumento en los animales con operación simulada o con lesión parcial, aunque no alcanzaron ser significativos, mientras que en los animales con lesión completa, ovulantes o no, fue similar a la del grupo testigo absoluto (Tabla 2).

Tabla 2. Media \pm e.e.m. de la concentración de 17 β -estradiol (E₂) y progesterona (P₄) de ratas testigo absoluto (TA), con operación simulada (OS), con lesión parcial o completa del núcleo dorsal del raquí, inducida por la administración de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

Grupo	n	E ₂ (pg/ml de suero)	P ₄ (ng/ml de suero)
TA	7	32.3 \pm 7.0	3.9 \pm 0.7
OS	6	19.8 \pm 4.1	8.1 \pm 1.8
Lesión parcial	6	28.9 \pm 4.5	6.0 \pm 1.5
Lesión completa			
Ovulantes	7	38.8 \pm 5.4*	2.3 \pm 0.5* *
No ovulantes	4	28.7 \pm 3.8	3.1 \pm 0.5*

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

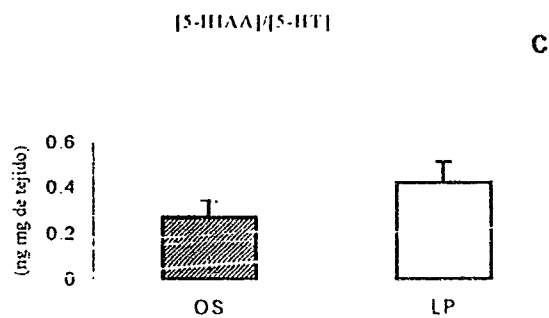
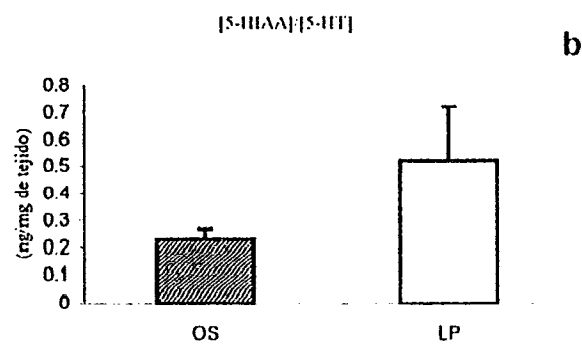
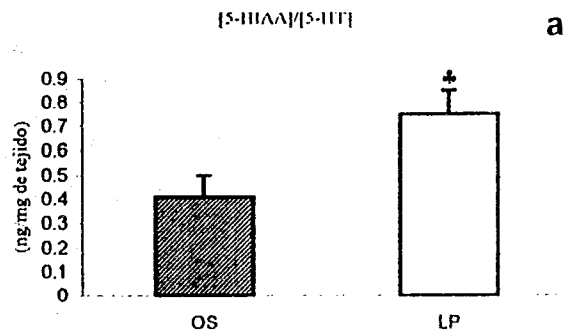
* p<0.05 vs. grupo LP (Prueba de "t" de Student)

En el hipotálamo anterior de los animales con lesión parcial o completa del núcleo dorsal del raquí (ovulantes y no ovulantes), no se presentaron cambios en la concentración de serotonina y de su metabolito el ácido 5-hidroxiindolacético.

En cambio, en los animales con lesión parcial y con lesión completa que no ovularon, la actividad de la neurona serotoninérgica aumentó de manera significativa (Fig. 3).

En el hipotálamo medio de los animales con lesión parcial, la concentración del neurotransmisor disminuyó de manera significativa, (0.58 \pm 0.2 vs. 1.51 \pm 0.2, p<0.05); lo mismo ocurrió en los animales con lesión completa que ovularon y lo que no lo hicieron (0.85 \pm 0.2; 0.79 \pm 0.1 vs. 1.51 \pm 0.2, p<0.05, respectivamente). La actividad serotoninérgica del hipotálamo mostró un incremento significativo sólo en los animales con lesión completa que no ovularon en el día del estro vaginal (Fig. 4).

En el hipotálamo posterior no se observaron modificaciones significativas en ninguno de los parámetros estudiados.



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

Figura 3. Media \pm e.e.m. de la actividad de la neurona serotoninérgica [5-HIAA/5-HT] en el hipotálamo anterior (a), medio (b) y posterior (c) de ratas con operación simulada (OS) o con lesión parcial (LP) del núcleo dorsal del rapé inducida por la administración de 5,6-dihidroxitriptamina (10 μ g/2.5 μ l) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

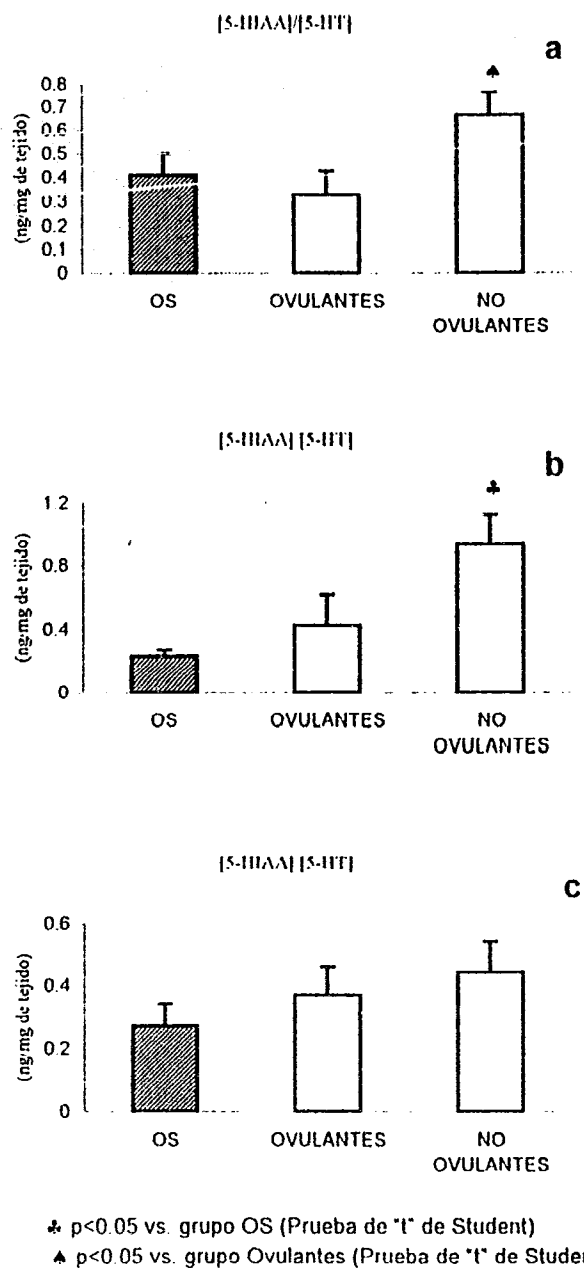


Figura 4. Media \pm e.e.m. de la actividad de la neurona serotoninérgica (5-HIAA/5-HT) en el hipotálamo anterior (a), medio (b) y posterior (c) de ratas con operación simulada (OS) o con lesión completa (ovulantes o no ovulantes) del núcleo dorsal del rapé inducida por la administración de 5,6-dihidroxitriptamina ($10\mu\text{g}/2.5\mu$) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio apoyan la idea de que en el animal prepúber la inervación serotoninérgica del hipotálamo anterior y medio que se origina en el núcleo dorsal del rafé, participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas y la primera ovulación (Ayala y col., 1998).

El retraso en la edad del primer estro vaginal observado en los animales con inyección intranuclear de vehículo, puede ser el resultado de la modificación temporal en la secreción de estrógenos que preceden el pico preovulatorio de las gonadotropinas. Este evento podría ser el resultado de la estimulación del sistema provocada por la acidez del vehículo, lo que se traduciría en un incremento en la secreción de corticoides por la glándula suprarrenal. El aumento en la concentración de progesterona observado en estos animales, apoya esta idea, dado que se sabe que las hormonas producidas por la corteza suprarrenal (corticosterona y progesterona) regulan de manera inhibitoria los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad (Ramaley 1974). Además es posible que al introducir la aguja de microinyección se seccionarán fibras que se encuentran involucradas en los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad. Esta idea es apoyada por los trabajos que muestran que la lesión de la sustancia gris periacueductal provoca la hipertrofia de la glándula adrenal (Reissenweber y col., 1967).

El retraso en la edad de la canalización y del primer estro vaginal en los animales que se les inyectó la 5,6-DHT, no podría ser explicado por una disminución en la secreción de estrógenos y progesterona dado que en estos animales en el día del estro vaginal las concentraciones de dichas hormonas fueron semejantes a las del testigo absoluto, aunque no se puede descartar que exista un desfase temporal en la secreción hormonal en estos animales.

El bloqueo de la ovulación en el 53% de los animales con lesión completa, nos permite pensar que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal del rafé participa de manera estimulante en la secreción "cíclica" de la GnRH y la LH y la ovulación. Esta afirmación es apoyada por los estudios de Meyer (1978) quien mostró que en la rata prepúber la administración de 5,7-DHT bloquea la ovulación inducida por la PMSG y por Van de Kar y col., (1980), que señala que el mismo tratamiento en la rata macho disminuye la concentración de la LH en plasma.

En estos animales, el incremento en la actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo medio, sería el resultado de la regulación que el núcleo medial del rafé ejerce sobre la secreción de las gonadotropinas, cuando falta el núcleo dorsal. Esta idea es apoyada por las evidencias que señalan que existe una comunicación neural entre ambos núcleos (Frazer y Hensler 1994), que ambos inervan al hipotálamo de forma diferencial y que en la eminencia media se encuentra el centro inhibitorio (Johnson y Crowley 1986; Van de Kar y col., 1980). Por ello, es posible que el bloqueo de la ovulación en los animales con lesión completa se debe a que este centro

inhibitorio se encuentra activado por la información neural que se origina en el núcleo medial del raqué.

La disminución en el número de ovocitos liberados observada en los animales con lesión completa del núcleo dorsal de raqué, podría ser el reflejo de la disminución en la secreción de las gonadotropinas debido a que no se eliminó completamente la información serotoninérgica del hipotálamo proveniente del núcleo dorsal. A diferencia de lo que se presentó en los animales con bloqueo de la ovulación, la actividad de la neurona serotoninérgica en el hipotálamo medio no se modificó de manera significativa. Estos eventos permiten sugerir que en dichos animales, el daño inducido por la inyección de la 5,6-DHT en el núcleo dorsal no fue suficiente para activar el centro inhibitorio que se localiza en el eminencia media y se bloqueará la secreción de las gonadotropinas.

La reducción en el número de ovocitos liberados en el grupo de animales con lesión completa del núcleo dorsal del raqué no concuerda con lo observado por Ayala y col., (1994) donde se mostró que la lesión térmica del núcleo dorsal bloquea la ovulación en el 100% de los animales. Una posible explicación a esta diferencia, es que la lesión térmica destruye tanto a las neuronas serotoninérgicas como a las dopaminérgicas, presente en dicho núcleo y de fibras neurales que llegan o corren a través de dicho núcleo.

La ovulación normal observada en los animales con lesión parcial del núcleo dorsal del raqué nos permite sugerir que debido a que la mayor parte de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que se origina en este núcleo permaneció sin daño, no se modificó la secreción de la GnRH, las gonadotropinas y la ovulación.

El núcleo dorsal del raqué es la fuente principal de serotonina del hipotálamo medio (núcleo arcuato y eminencia media), mientras que el núcleo medial proyecta sus fibras principalmente al hipotálamo anterior (Villar y col., 1984). Estas evidencias morfológicas concuerdan con los resultados obtenidos en este estudio, en el que se muestra que la lesión completa del núcleo dorsal del raqué, disminuye de manera significativa la concentración de esta amina en el hipotálamo medio, mientras que en el anterior y posterior no se presentan cambios significativos.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que la inervación serotoninérgica que se origina en el núcleo dorsal participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la secreción de las gonadotropinas y la primera ovulación y al parecer los efectos de la lesión de este núcleo depende de la zona dañada, debido a que la ovulación no se modifica cuando se elimina parcialmente dicho núcleo, mientras que cuando se elimina completamente la ovulación se bloquea.

BIBLIOGRAFÍA

AYALA M. E. (1995). Participación del sistema serotoninérgico en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la pubertad en la hembra. La rata como modelo experimental. Tesis de Doctorado. Instituto de Neurobiología, U.N.A.M.

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

AYALA ME., MONROY J., MORALES L., MANRREZA ME. y DOMINGUEZ R. (1998). Effects of a lesion in the dorsal raphe nucleus performed during the juvenile period of the female rat, on puberty. Enviado a publicar en *Brain Research Bulletin*.

BECÚN-VILLALOBOS D. y LACAU-MENGIDO I. M. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoam.*, 40; 1-17.

FRAZER A. y HENSLER J. G. (1994). Serotonin. En: *Basic neurochemistry* eds. George, J. Siegel, Bernard. W. Agronoff, R. Wayne Alvers, Perry B. Molinogf. Raven Press. New York. 238-319.

JOHNSON M. D. y CROWLEY W. R. (1986). Role of central serotonin systems in the stimulatory effects of ovarian hormones ad naloxone on luteinizing hormone release in female rats. *Endocrinology*, 118; 1180-1185.

JENNES D., STUMPF W. E. y TAPPAZ M. L. (1983). Anatomical relationships of dopaminergic and GABAergic systems with the GnRH-systems in the septo-hypothalamic area. *Experimental Brain Research*, 50; 91-99.

KERDELHUE B., BOJDA F., LESIEUR P., PASQUALINI C., EL ABED A., LENOIR V., DUILLET P., CHIUEH C. M. y PALKOVITS M. (1989). Medial eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology*, 4; 176-180.

KORDON C., DROUVAS S. V., MARTINEZ DE LA ESCALERA, G. y WEINER R. I. (1994). Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: *"The physiology of reproduction"* second edition. Edits. E. Knobil y J. D. Neill Raven Press. New York, USA. Cap 27, 1621-1681.

LUNA L. G. (1975). *Manual of histology staining methods of the Armed Forces Institute of Pathology*. Mcgraw-Hill bool co., New York, p 21.

MEYER D. C. (1978). Hypothalamic and raphe serotoninergic systems in ovulation control. *Endocrinology*, 103; 1067-1074.

MONTAGNE M. y CALAS A. (1988). Serotonin ad endocrinology the pituitary. En: Neuronal serotonin, eds. N.N. Osborne. M-Hamon, New York, p 271-304.

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

MORELLO H., CALIGARIS L., HAYMAL B., y TALEISNIK, S. (1989). Inhibition of proestrous LH surge and ovulations in rats evoked by stimulation of the medial raphe nucleus involves a GABA-mediated mechanism. Neuroendocrinology, 50; 81-87.

OJEDA S. R. y URBANSKI H. F. (1994). Puberty in the rat. En: "The physiology of reproduction" second edition. Edits. E. Knobil y J. D. Neill Raven Press. New York, USA. Cap 40, 363-409.

PAXINOS G., WATSON C. (1982). The rat brain in stereotaxic coordinates. Academic Press. New York USA.

RAMALEY J. (1974). Minireview: Adrenal-gonadal interactions at puberty. Life Sci. 14; 1623-1633.

REISSENWEBER J. J., DOMINGUEZ R., GRIÑO E., SAS J., BENEDETTI W. y APPELTAUER L. C. (1967). Sex differences of the response of the adrenal gland of the rat to mesencephalic lesions. Acta endocrinologica (Kbh) 54; 263-274.

SHANNON N. J., GUNNET J. W. y MOORE K. E. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neural activity following electrical stimulation of the raphe nucleus. J. Neuroch., 47; 959-965.

SHERWOOD N. M. y TIMIRAS P. S. (1970). A stereotaxic atlas of the developing rat brain. University of California Press. New York, USA. 1283-1304.

STANTFORD T. R. y WIRTSHAFTER D. (1990). Ascending dopaminergic projections from the dorsal nucleus in the rat. Brain Research, 511; 173-176.

TAKEUCHI Y. (1988). Distribution of serotonin neurons in the mammalian brain. En: Neuronal serotonin, eds. N.N. Osborne. M-Hamon, New York, p 25-56.

VILLAR J. M., CHIOCCHIO S. R. y TRAMEZAN, J. A. (1984). Origin and termination of dorsal raphe-median eminence projection. Brain Res., 324; 165-170.

VAN DE KAR L. D. y LORENS S. A. (1979). Differential serotonergic innervation of individual hypothalamic nuclei and other forebrain regions by the dorsal and medial midbrain raphe nuclei. Brain Res., 162; 45-54.

VAN DE KAR L. D., LORENS S. A. VODRASKA A., ALLEN G., GREEN M., VAN ORDEN D. E. y VAN ORDEN L. S. (1980). Effect of selective midbrain and diencephalic 5,7-dihydroxytryptamine lesions on serotonin content in individual preopticohypothalamic nuclei and on serum luteinizing hormone level. *Neuroendocrinology*, 31; 309-315.

VITALE M. L., VILLAR M. J., CHIOCCHIO S. R. y TRAMEZZANI J. H. (1987). Dorsal raphe lesion alters the estrous cycle and the preovulatory gonadotropin release. *Neuroendocrinology*, 46; 252-257.

VITALE M. L. y CHIOCCHIO S. R. (1993). Serotonin, a neurotransmitter involved in the regulation of luteinizing hormone release. *Endocrinology Reviews*, 14; 480-493.

ABSTRACTS

SOCIETY FOR NEUROSCIENCE

28TH ANNUAL MEETING • LOS ANGELES, CALIF. • NOVEMBER 7-12, 1989

24



143.17

PRESENCE OF cAMP RESPONSE ELEMENT-BINDING PROTEIN (CREB) IN THE POSTSYNAPTIC SITES OF THE BRAIN. S. Maake¹, T. Suzuki¹, N. Usuda¹, H. Ishiguro², T. Nagatsu³, and K. Okumura⁴. ¹Dept. of 2nd Int. Med., ²Dept. Biochem., Nagoya City Univ. Med. Sch., Mizuho-ku, Nagoya 467-8601, ³Dept. Neuroplasticity, Res. Center on Aging and Adaptation, ⁴Dept. Anatomy, Shinshu Univ. Sch. Med., 3-1-1 Asahi, Matsumoto 390-8621, ⁵Inst. Compr. Med. Sci., Sch. Med., Fujita Health Univ., Toyoake Aichi 470-1192, Japan

The postsynaptic density (PSD) fraction prepared from the rat forebrain contained a transcription factor, cAMP response element-binding protein (CREB). The occurrence of CREB in the PSD was confirmed by immunoelectron microscopic examination. CREB in the PSD fraction was phosphorylated both by protein kinase A and Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II (CaMKII) endogenous to the fraction, and dissociated from the PSD after phosphorylation, especially under CaMKII-activated conditions. The fraction containing CREB that was released from PSD after phosphorylation possessed cAMP response element (CRE)-binding activity. Thus, PSD anchors functionally active CREB. These results suggest that CREB anchored to the PSD is liberated by phosphorylation upon specific synaptic stimulation, translocate into the nucleus, and then triggers synaptic activity-dependent changes in gene expression. [This research was supported by a Grant-in-Aid for Scientific Research from the Japanese Ministry of Education, Science and Culture, The Ichiro Kanehara Foundation, and Toyota Physical & Chemical Research Institute.]

143.18

CAMP RESPONSE ELEMENT BINDING PROTEIN, CREB, MEDIATES NPY Y-1 RECEPTOR SIGNAL TRANSDUCTION PATHWAY
S. Shen¹, W. I. Chance¹, J. E. Fisher¹, A. Rizo², and A. R. Ghazizadeh¹. ¹Departments of Surgery, Cell biology, Neurobiology and Anatomy University of Cincinnati Medical Center, Cincinnati, OH-45267.

Activation of NPY receptors either induces the release of intracellular Ca²⁺ or inhibits the production of cAMP. However, the downstream signal transduction pathways involved in NPY mediated biological functions are unknown. Our previous findings suggest that CREB is involved in the NPY induced feeding signal. To further confirm and elucidate the role of CREB in NPY induced signal transduction pathways, we used Y-1 receptor expressing SK-N-MC cell line transfected with CREB trans-reporting systemTM. SK-N-MC cells were transfected with pFR-Luc reporter plasmid containing yeast GAL4 binding site and luciferase gene and pA2-CREB expression vector (contains CMV promoter, yeast GAL4 DNA binding domain fused by the activation domain of CREB) or pFC-FKA expression plasmid (contains CMV promoter and the catalytic subunit of PKA). Twenty four hours after transfection, cells were treated with 100 nM of Leu³¹-Pro³⁴-NPY, a Y-1 receptor selective agonist. Four hours later, the luciferase gene activity was monitored. pFC-FKA co-transfection with pFR-Luc reporter plasmid resulted in a 1.5 fold increase in luciferase activity in comparison to pFR-Luc reporter transfected cells (basal). Leu³¹-Pro³⁴-NPY treatment had no significant effect on basal or PKA stimulated luciferase activity. Co-transfection of reporter plasmid with pA2-CREB vector stimulated the luciferase activity to 70 fold. Leu³¹-Pro³⁴-NPY treatment significantly attenuated CREB induced luciferase activity to 56 fold (P<0.05). In contrast, cells co-transfected with reporter plasmid and pFC2-000 vector lacking activation domain of CREB protein did not show any effect on luciferase activity in comparison to basal. Furthermore, Leu³¹-Pro³⁴-NPY treatment to CHO cells transfected with Y-1 receptor, pA2-CREB and pFR-Luc vectors exhibited similar inhibitory effect on luciferase activity. These findings suggest that CREB is involved in the signal transduction pathways of Y-1 receptor system and the activation domain of CREB is essential for this pathway. Supported by NIH GM 47122.

HPG REGULATION II

144.1

EFFECTS OF THE MICROINJECTION OF 5,6-DIHYDROXYTRYPTAMINE (5,6-DHT) INTO THE MEDIAL RAPHE NUCLEUS (MRN) ON PUBERTY AND FIRST OVULATION IN THE FEMALE RAT. J. Monroy¹, M. E. Castro¹, M. E. Asala¹, R. Chavira¹ and R. Dominguez². ¹UIBR, FES Zaragoza, UNAM México AP 9020 CP 15,000 ²Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" (Laboratorio de hormonas esteroides)

There is evidence that the dorsal raphe nucleus (DRN) and the MRN play a different role in the regulation of gonadotropin secretion. We have shown that the DRN blocks ovulation at puberty. In present study we analyzed the effects of 5,6-DHT microinjection into the MRN of 30 days-old rats on puberty (age of vaginal opening [V.O.], age of first vaginal estrous [V.E.]), 17 β -estradiol (E₂) and progesterone (P₄) serum concentration. Differences in ovulation rate and number of ova shed, were not observed. The results are in the table.

Group	V.O.	V.E.	Ovaries	E ₂ (pg/ml)	P ₄ (ng/ml)
Control	40.2±0.5	40.6±0.5	35.6±1.4	32.3±7.0	4.0±0.7
Sham	42.7±0.7*	43.1±0.7*	35.6±2.1	15.9±0.3*	7.7±2.6
Lesion					
Complete	44.5±0.6*	45.1±0.6*	35.6±2.1	15.3±2.1*	7.9±1.1
Partial	41.8±0.4*	42.6±1.0	29.2±2.1*	13.2±5.7	6.5±2.0
Complete	45.0±1.0*	48.0±3.1*	36.1±4.5	10.5±1.0*	9.8±4.5

* p<0.05 vs control group

Present results suggest that in the prepubertal rat the serotonergic innervation originating in the MRN plays a stimulatory role on estrogen secretion, and did not participate in the regulation of ovulation.

Supported by DGAPA in 208796 and PUIS UNAM

144.2

RELAXIN EFFECT ON THE SYNTHESIS OF HYPOTHALAMIC OXYTOCIN IN LATE PREGNANT RATS. P. A. Heine¹, L. L. Anderson¹, S. Jelfinia^{1,2}. ¹Departments of Biomedical Sciences and ²Animal Science and the Neuroscience Program, Iowa State University, Ames, Iowa 50011.

The objective of this experiment was to study the effect of relaxin on the synthesis of oxytocin (OT). Relaxin is known to affect the release of OT, however it is unclear whether relaxin also has an effect on the synthesis of OT. Previous studies have shown that relaxin administered to late pregnant rats causes the expression of Fos in OTergic cells of the hypothalamus. Fos is a transcription factor; therefore its presence in cells indicates that transcription within that cell is being altered. The expression of Fos in OTergic cells following administration of relaxin suggests that OT synthesis is affected by relaxin. We used *in situ* hybridization to further investigate this possibility. Four groups of rats were studied: ovariectomized late pregnant rats treated with or without systemic relaxin, untreated control rats and sham ovariectomized rats. Three different time points prior to parturition were chosen to compare the amount of OT mRNA present in the suprachiasmatic (SCN) and paraventricular nuclei in the 4 groups. Oligonucleotide probes labeled with ³⁵S were made and used to bind to the OT mRNA found *in situ*. Following hybridization, slides containing hypothalamic brain sections were exposed to radiographic film. Subsequently, the film was developed and image analysis was used to quantitatively compare between treatments. Analysis of initial data shows a denser population of OT mRNA in the SCN of animals with circulating relaxin. Further results will be discussed, however, the present data indicate that relaxin facilitates the synthesis of OT during pregnancy. Support for this research came from USDA, CSRS, NRICGP Competitive Grant 93-37223-8965.

144.3

SEXUAL DIFFERENCE IN THE EFFECT OF MATING ON GONADOTROPIN RELEASING HORMONE (GnRH) NEURONS EXPRESSING FOS PROTEIN IN THE RABBIT FOREBRAIN. M. Cabal¹, C. Bever², G. Gonzalez-Mariscal² and R. Silver³. ¹Instituto de Invs Biologicas, Universidad Veracruzana, A.P. 114, Xatapa, Ver., ²CIRA, CINVESTAV-LAT (Mexico) and ³Columbia University (USA)

The purpose of this study was to determine, by immunocytochemistry, the expression of the immediate early gene *c-fos* as an index of neuronal activity in relation to mating in GnRH and non GnRH neurons in rabbits. Mated female (n=4) and male (n=4) New Zealand rabbits were perfused 90 minutes after copulation and the sections (50 μ m) were sequentially incubated with the polyclonal antibody DA 11-824 against fos oncoproteins (Genosys) and the monoclonal antibody HUGH against GnRH (donated by Dr. H. Urbanski). Fos nuclear staining (black reaction product) was detected in the preoptic area, bed nuclei of the stria terminalis, anterior hypothalamic area, medial basal hypothalamus and medial amygdala in males and females. However, there was a drastic sex difference in relation to GnRH neurons (brown cytoplasmic product) which coexpress fos. In the female, approximately 30% of GnRH neurons also show fos immunoreactivity throughout their rostrocaudal distribution, though they were mainly concentrated in the preoptic area, near the organum vasculosum of lamina terminalis, and in the bed nuclei of the stria terminalis. No double labelled cells were detected in males. Results indicate that rabbits of both sexes express fos protein after copulation in the hypothalamus and limbic system but the somatosensory stimulation received activates the GnRH system only, in females. Supported by CONACYT 1845P-N to M.C.

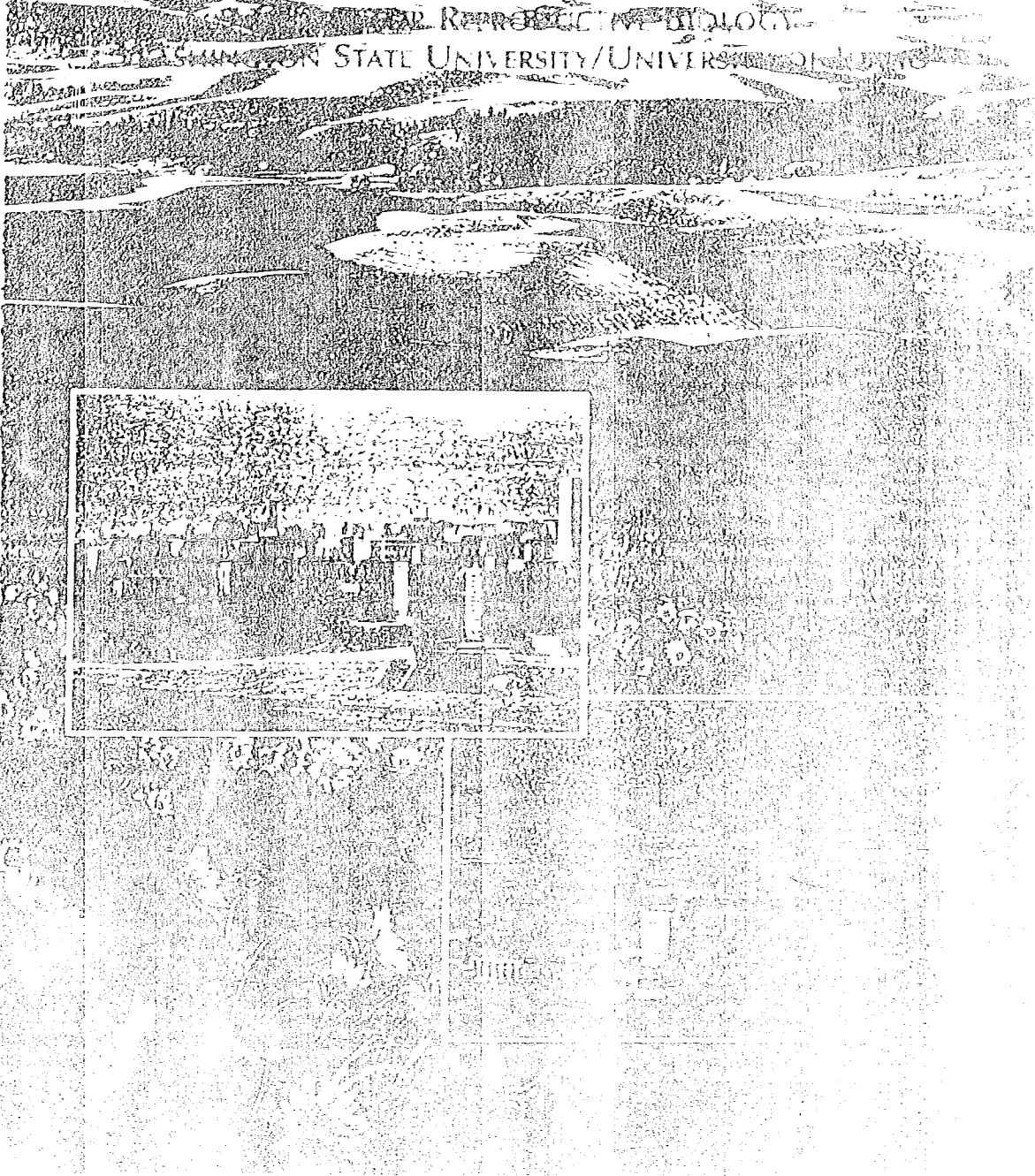
144.4

SEASONAL NATURE OF THE ESTRADIOL-INDUCED FOS EXPRESSION IN A SUBSET OF ESTROGEN RECEPTOR-CONTAINING NEURONS IN THE PREOPTIC AREA OF THE EWE. L. Stefanovic¹, B.A. Adria¹ and R.L. Goodman². ¹Dept. of Physiology, West Virginia University, Morgantown, WV 26406 and ²Sch. Hth Sci, Grand Valley State Univ., Allendale, MI 49401

In the ewe, seasonal anestrus results from a change in the hypothalamic responsiveness to estradiol (E₂) negative feedback. Various studies have demonstrated a role of hypothalamic dopaminergic cell groups in this seasonally dependent E₂ effect. However, these neurons do not possess α -estrogen receptors (ER), therefore suggesting existence of another neural system mediating E₂ inhibition. We have previously reported (Neurosci Abstr 21,1891,1995) that 7 days of E₂ treatment during anestrus significantly increased the percentage of ER-containing neurons expressing the immediate early gene product, Fos (1.7% vs. 17.8%) in the preoptic area (POA) near the OVLT, but not in other hypothalamic areas. To test the hypothesis that activation of these ER-containing neurons occurs only in anestrus, we compared the effect of E₂ treatment on Fos-ER colocalization, during the breeding season and anestrus, utilizing the newly available mouse anti-human ER antibody (Dako Corporation). Ovariectomized (OVX), breeding season ewes were bled for 4 hours at 12 min intervals, and implanted with either a blank (n=5), or E₂ filled (n=5), 0.5 cm Silastic capsule. Seven days later, animals were bled again for 4 hours at 12 min intervals, their brains fixed, removed, sectioned and stained for ER and Fos using a dual immunofluorescence procedure. E₂ treatment failed to significantly increase the percentage of ER-containing neurons expressing Fos (OVX, 3.47±1.92% vs. OVX+E₂, 1.81±0.85%). The same procedure was repeated in another group of 10 animals during anestrus: hypothalamic sections from 2 OVX and 2 OVX+E₂ ewes have been analyzed. Both E₂ treated and control animals exhibited ER-Fos colocalization that closely follows our previous findings in anestrus ewes (16.4% and 10.4% vs. 3.2% and 1.9% respectively). These data suggest that a subset of ER-containing neurons in the POA near the OVLT plays a role in the seasonal change in response to E₂ negative feedback. Support: ROI-HD17864

SOCIETY *for the* STUDY *of* REPRODUCTION

3rd Annual Meeting, July 31 - August 3, 1999



ABSTRACTS

511. INHIBITORY ACTION OF GOSSYPOL ON THE GROWTH OF MAT-LyLu PROSTATE CANCER CELLS IS ASSOCIATED WITH STIMULATION OF TRANSFORMING GROWTH FACTOR- β , (TGF- β). J Jiang¹, SK Kulp¹, Y Sugimoto¹, Y Zhang¹, YC Lin.¹ Lab Reprod & Molec Endocrinology, College of Vet Med, Ohio State Univ, Columbus, OH.¹

Gossypol (GP), a polyphenolic compound naturally occurring in cottonseed, has gained interest as an anticancer agent. We have shown that GP inhibits in vitro growth of PC3, MCF-7 and primary cultured human prostate cells, as well as the in vivo tumor growth and lung and lymph node metastasis of the androgen-independent prostate cancer cell line, MAT-LyLu, after implantation into Copenhagen rats. Our previous results implicated the induction of TGF- β mRNA expression as a mechanism of growth inhibition in PC3 human prostate cancer cells in vitro. The present study examined GP's effects on the growth of MAT-LyLu cells and its mechanism of action. For DNA synthesis, MAT-LyLu cells were treated with different concentrations of GP (0, 0.25, 0.5 and 1 μ M) for 24 h, followed by 3 h treatment with ³H thymidine (5 μ Ci/ml). GP caused reductions in DNA synthesis of 33.4%, 53.2%, and 94.3% at 0.25, 0.5 and 1 μ M, respectively ($p < 0.05$). Similarly, GP prolonged the doubling time of MAT-LyLu cells by 33%, 42% and 89.8% at 0.25, 0.5 and 1 μ M, respectively. RT-PCR revealed that GP at concentrations of 0.5 and 2.0 μ M induced 2-fold and 3-fold increases, respectively, in TGF- β mRNA levels. ELISA results showed that, at a concentration of 4 μ M, GP caused a 3-fold increase in TGF- β protein secretion. The results indicate that the inhibitory action of GP in MAT-LyLu cells involves the induction of TGF- β . Currently, we utilize the MAT-LyLu-Copenhagen rat system as an in vivo model of metastasis. We have isolated metastatic cells from the lungs of MAT-LyLu tumor-bearing Copenhagen rats, which result in tumor growth upon reimplantation into this rodent prostate cancer model. This in vivo model will be used to continue our investigations of the effects of GP and other chemotherapeutic agents on metastasis. (NIH grants CA66193 and P30CA16058)

512. EFFECTS OF THE INJECTION OF 5,6-DIHYDROXYTRYPTAMINE (5,6-DHT) INTO THE DORSAL (DRN) OR MEDIAL (MRN) RAPHE NUCLEUS ON FIRST OVULATION. J Monroy¹, ME Castro¹, ME Ayala¹, R Dominguez.¹ Biology of Reproduction Research Unit, FES Zaragoza UNAM, Mexico DF, Mexico.¹

The serotonin innervation of the hypothalamus derives from neurons located in the dorsal and medial raphe nuclei. In the adult rat these nuclei play different roles in that regulation of secretion of GnRH and gonadotropins. Also there is evidence that the participation of serotonin in the regulation of gonadotropin secretion is different in adult and pre-pubertal animals. Based on this observations we decided to analyze the effects of the injection of 10 mg of 5,6-DHT or ascorbic acid into the DRN or MRN of 30-day-old rats on first ovulation. A nontreated control group was also included. The animals were sacrificed on the day of first vaginal estrus. Ascorbic acid injection into the DRN or MRN did not affect ovulation (16/18 and 10/14 ovulated vs. 37/47) nor the number of ova shed (8.9 ± 0.7 , 9.3 ± 7 vs. 8.9 ± 4). The injection of 5,6-DHT into the DRN resulted in the partial blockade of ovulation (11/26 did not ovulate vs. 2/18 injected with ascorbic acid, $p < 0.05$). The number of ova shed by ovulating animals was lower (6.4 ± 0.6 vs. 8.9 ± 0.7 , $p < 0.05$). When the injection of the 5,6-DHT was realized into the MRN, the ovulation rate and the number of ova shed were similar to those injected with ascorbic acid. This result suggests that the serotonergic innervation arising in the DRN is essential for the ovulation occurring at puberty, while it seems that the MRN did not participate. Supported by DGAPA IN-2088796, PAEP and PUIS.

513. EFFECTS OF THYMULIN INJECTION TO INFANTILE THYMECTOMIZED MICE TREATED WITH GONADOTROPINS. L Garcia¹, P Rosas¹, R Dominguez.¹ Biology of Reproduction Research Unit, FES-Zaragoza, UNAM, Mexico DF, Mexico.¹

Thymectomy performed on 10-day-old mice delays puberty and decreases follicular population (Biol Reprod 52, Supp 1:296). In prepubertal mice, thymulin stimulates gonadotropin (GnRH)-induced ovulation (Biol Reprod 54, Supp 1:115). We studied the ovulatory response to GnRH administration in 10-day thymectomized mice (Tx-10) and the effects of thymulin treatment prior to GnRH injection. Beginning on day 10 of age, groups of Tx-10 and control mice were treated daily with thymulin (12 ng/g bw) or saline. On day 25 the animals were injected with 1 IU of eCG, 54 h later with 3 IU of hCG and killed 20 h later. The ovulation rate was similar in control and Tx-10 mice treated with GnRH. The number of ova shed (7.6 ± 0.8 vs. 13.4 ± 1.3 , $P < 0.05$) and the uterine weight (50.0 ± 2.9 vs. 95.5 ± 11.7 , $P < 0.05$) were significantly lower in Tx-10-GnRH-treated mice. In control animals thymulin injection did not modify GnRH-induced ovulation, while in Tx-10 mice, thymulin treatment provoked a significant increase in the number of ova shed (11.8 ± 0.6 vs. 7.6 ± 0.8 , $P < 0.05$) and uterine weight (84.9 ± 4.6 vs. 50.0 ± 2.9 mg, $P < 0.05$). Estradiol (7.2 ± 1.5 vs. 33.6 ± 8.8 , pg/ml, $P < 0.05$) and progesterone (5.6 ± 1.0 vs. 9.0 ± 0.6 ng/ml, $P < 0.05$) serum levels were significantly lower in Tx-10 animals. Thymulin administration prior to GnRH injection to normal animals resulted in a decrease in estradiol and progesterone serum levels (8.4 ± 2.0 vs. 33.6 ± 8.8 ; 6.1 ± 0.7 vs. 9.0 ± 0.6 , $P < 0.05$). In Tx-10 thymulin-GnRH-treated animals, estradiol levels increased (14.0 ± 2.7 vs. 7.2 ± 1.5 , $P < 0.05$). Present results suggest that thymulin is responsible for the low ovulatory response to exogenous GnRH in Tx-10 mice. Thymulin also seems to play a role in the regulation of steroid hormone release. Supported by DGAPA IN225598.

514. TO DETERMINE THE EFFECT OF NEUROTOXIC LESION OF THE ARCUATE NUCLEUS ON REPRODUCTIVE FUNCTION IN THE GROWTH-RESTRICTED FEMALE RAT WITH DELAYED PUBERTY. DE Hendricks Jr¹, EA Meyers¹, JE Rhea¹, K-D Vo¹, H I'Anson.¹ Biology Dept, Washington and Lee Univ, Lexington, VA.¹

A single injection of monosodium glutamate (MSG) to the neonatal female rat destroys glutamate sensitive neurons in the arcuate nucleus (ARC) and subsequently induces precocious puberty (*Neuroendocrinology* 52:143-149; 1990). We determined if such glutamate sensitive neurons play a role in the transduction of metabolic signals to the reproductive axis of the developing female rat. In our model puberty is delayed by growth-restriction, but may be rapidly reinstated by