

U. A. M. IZTAPALAPA BIBLIOTECA

" Una vez más la luz del camino
se hace presente "

105960

Doy gracias a mis padres, hermano y familiares que hoy y siempre me han querido y apoyado.

A Roberto, quién me ha brindado su paciencia, apoyo y sus invaluable conocimientos en la área de Biología de la Reproducción.

A mis compañeros del Laboratorio de Biología de la Reproducción en la ENEP y a las demás personas, por su apoyo y amistad.

Al Dr. A. Ulloa-Aguirre y Biol. Pablo Damián, del Instituto de Nutrición, Salvador Zubirán, por su ayuda para la realización de ésta tesis.

A mis maestros e integrantes del Jurado revisor de esta tesis, los cuales han sido participe en nuestro desarrollo profesional.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de CONACyT y del Programa Universitario de Investigación en Salud, UNAM.

p.t. y p.m.

CONTENIDO	Página:
RESUMEN:	2
I. INTRODUCCION:.....	5
1. FOLICULOGENESIS	6
1.1 Estructura general de los folículos	6
1.2 Diferenciación folicular	8
1.3 Regulación del crecimiento y la diferenciación de los folículos	12
1.4 Acción de las gonadotropinas y los esteroides.	13
1.5 Atresia folicular	16
2. PUBERTAD	17
2.1 Eventos neuroendócrinos desde el periodo infantil hasta la pubertad.....	18
3. HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO Y SUS ISOHORMONAS	22
II. PROPOSITO DEL TRABAJO	26
III. HIPOTESIS Y OBJETIVOS	27
IV. MATERIALES Y METODOS	28
V. RESULTADOS	35
VI. DISCUSION	57
VII. CONCLUSIONES	62
VIII. BIBLIOGRAFIA	63

RESUMEN

La foliculogénesis es regulada por las gonadotropinas hipofisarias y las hormonas sexuales secretadas por el ovario, cuyos efectos son modulados por la información neural que llega al ovario. En el presente estudio se analizó la relación entre el crecimiento folicular inducido en la rata prepúber por la inyección de la gonadotropina del suero de yegua preñada [PMSG] o las isohormonas de la hormona estimulante del folículo [rFSH] y la edad en la que los animales fueron tratados. Para ello se utilizaron ratas prepúber de edades comprendidas entre los 21 y 30 días, que fueron inyectadas con 3, 6 o 8 ui de PMSG y sacrificadas a las 24, 48 y 72 horas. En otro experimento animales de 24 y 27 días fueron tratados con isohormonas de FSH, aisladas de la hipófisis de ratas macho adultos castrados.

En los animales de 21, 24, 27 y 30 días de edad tratados con 3, 6 o 8 ui de PMSG s.c. la tasa de animales ovulantes dependió de la edad del animal. En el animal de 21 días no se produjo la ovulación, ni la apertura vaginal; en aquellos tratados a los 24 días con PMSG, 19/32 animales abrieron vagina y sólo ovularon 7 de los 12 tratados con 8 ui; en los animales de 27 y 30 días tratados con las tres dosis 65/87 ovularon y 72/87 abrieron vagina. En los animales de 30 días el número de ovocitos liberados por animal ovulante dependió de la dosis [3 ui: 5.9 ± 0.4 ; 6 ui: 12.7 ± 2.3

y 8 ui: 30.0 ± 1.6 ovocitos].

El peso de los ovarios y el útero aumentó en respuesta al tratamiento con PMSG. El aumento en el peso del útero fue mayor en los animales que además recibieron hCG [PMSG+hCG 123.6 ± 6.1 vs PMSG 81.9 ± 8.9 , $p < 0.05$].

En los ovarios de las ratas tratadas con solución salina el diámetro folicular promedio aumentó a partir del día 23 hasta el día 29 [$203 \pm 5.4 \mu\text{m}$ vs 266 ± 6.7 , $p < 0.01$]. En cambio, el número de folículos medidos mostró fluctuaciones y disminuyó en forma significativa a partir del día 27 hasta el día 29 [171 ± 43 vs 99 ± 7 , $p < 0.05$]. En los animales tratados con PMSG los aumentos del diámetro folicular y las variaciones en el número de folículos medidos dependió de la edad y del lapso entre el tratamiento y la autopsia.

En los animales de 24 días, la inyección de PMSG provocó aumento de la tasa de folículos con diámetro mayor de $350 \mu\text{m}$ y disminuyó la tasa de folículos atrésicos.

En comparación con los resultados obtenidos en los animales tratados con solución salina, el número de folículos atrésicos aumentó en los ovarios de las ratas tratadas con la isohormona de FSH con menor contenido de ácido siálico [23.7 ± 1.8 vs 12.7 ± 3.7 , $p < 0.05$].

Estos resultados nos permiten concluir que en el animal prepúber, la respuesta ovulatoria a la administración de PMSG depende de la edad y la dosis. Que la PMSG estimula el

crecimiento de los folículos en maduración y disminuye la proporción de folículos atrésicos, efecto que depende de la edad del animal en estudio. Que el aumento del peso de los ovarios inducido por la PMSG es función de la dosis y no se correlaciona con la capacidad ovulatoria ni con el peso del útero. Que el aumento en el peso del útero provocado por las gonadotropinas que estimulan la síntesis de los esteroides sexuales depende del tiempo transcurrido entre la administración y la autopsia. Que las isohormonas de la FSH tienen efectos disimiles sobre la atresia folicular, lo que podría corresponder a diferentes actividades biológicas dependientes, entre otros, de la cantidad de ácido siálico presente en la molécula.

I. INTRODUCCION.

El folículo ovárico es la unidad anatómica y funcional del ovario. Su crecimiento y diferenciación son regulados por las gonadotropinas hipofisarias [hormona estimulante del folículo ; hormona luteinizante ; prolactina], las hormonas esteroideas y no esteroideas producidas por los propios folículos y por factores de diferentes orígenes [neurales, suprarrenales, tímicos, etc.] (18).

En el ovario se distinguen tres compartimientos: el folicular, formado por los folículos en las diferentes etapas de desarrollo, el intersticial y el luteal. Metodológicamente, el desarrollo de los folículos puede ser analizado en función de los siguientes parámetros (3, 7, 18, 54, 62):

- Diámetro de los ovocitos
- Diámetro de los folículos
- Número de células de la granulosa
- Presencia de la zona pelúcida
- Formación de las tecas interna e externa
- Desarrollo de antro o cavidad folicular
- Capacidad de respuesta a las gonadotropinas o a los esteroides
- Capacidad secretora
- Capacidad de ovulación

LISTA DE ABREVIATURAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO

FSH: Hormona estimulante del folículo
hCG: Gonadotropina coriónica humana
GH: Hormona del crecimiento
GnRH: Hormona liberadora de las gonadotropinas
LH: Hormona luteinizante
PMSG: Gonadotropina del suero de la yegua preñada
PRL: Prolactina
rFSH-A: Isohormona FSH con menor contenido de ácido siálico
rFSH-B: Isohormona FSH con mayor contenido de ácido siálico

1. FOLICULOGENESIS

El término foliculogénesis se utiliza para describir las diversas etapas por las que pasa un folículo desde su formación hasta que se produce la ovulación o la atresia.

El inicio de la foliculogénesis varía entre las diferentes especies de mamíferos. En algunas [mujer, mona, vaca, yegua, cerda y cobaya] la formación de los folículos se realiza durante la etapa fetal, por lo que al nacimiento ya existen folículos. En cambio, en otras la formación de los mismos se realiza después del nacimiento (3, 4, 55).

1.1 Estructura general de los folículos

El folículo está formado por el ovocito, las células de la granulosa que pueden formar de una a 12 capas alrededor del ovocito, la membrana basal, las células tecointersticiales que conforman la teca interna y la teca externa, el tejido conjuntivo, los capilares y las terminaciones nerviosas que llegan hasta la basal sin atravesarla (18).

En la mayoría de los mamíferos, desde el nacimiento el ovocito se encuentra en la etapa de dictioteno de la primera profase meiótica. El ovocito presenta microvellosidades que se interdigitan con las células foliculares cercanas. A medida que el folículo crece, aparecen espacios discontinuos entre el ovocito y las células de la granulosa

adyacentes, que son ocupados por una estructura que contiene mucopolisácaridos y proteínas, débilmente eosinófila que reacciona en forma positiva al reactivo de PAS, la que recibe el nombre de membrana pelúcida y es impermeable a los solutos de alto peso molecular como los polisacáridos y a las proteínas. La zona pelúcida aparece alrededor de los ovocitos que están rodeados por una capa de células granulosas cuboidales o en los folículos que presentan más de dos capas de células granulosas. En su formación participan las células foliculares y el ovocito (3, 7, 18, 48, 74).

Durante la mayor parte de la vida del folículo, las células de la granulosa se caracterizan por la presencia de numerosas mitocondrias con crestas en forma de anaque, cisternas en el retículo endoplásmico rugoso, ribosomas libres, gotitas de lípidos, aparato de Golgi. Numerosas desmosomas y nexos entre ellas, al igual que con el ovocito. Las células foliculares se localizan por dentro de la membrana basal que separa al folículo del tejido circundante y alrededor del ovocito (4, 7, 18, 55).

Las células de la teca interna se caracterizan por poseer abundante retículo endoplásmico liso tubular, gotitas de lípidos, mitocondrias con crestas tubulares, gran actividad de la enzima $\Delta^5-3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa [$\Delta^5-3\beta$ -OHED'asa] y de fosfatasa alcalina. Esta teca tiene abundante riego sanguíneo y linfático, presenta numerosas

terminaciones nerviosas libres o que se vinculan con los vasos. La teca externa se caracteriza por la presencia de tejido conectivo fibroso, fibroblastos, algunos vasos sanguíneos y linfáticos, células de tipo mioepitelial y muscular. Se considera que las tecas se originan de las células indiferenciadas que rodean por fuera a la membrana basal del folículo con antro y que la diferenciación de estas células es inducida por las células de la granulosa (3, 4, 6, 7).

1.2 DIFERENCIACION FOLICULAR

En el ovario de un animal adulto, el 90 % de los folículos son primordiales y el 10% restante están en las diferentes etapas del crecimiento y la diferenciación [fig A](3).

Los folículos primordiales o de reserva se localizan en la corteza del ovario, por debajo del epitelio superficial. Están formados por el ovocito, una capa de células planas [futuras células de la granulosa], la basal y las células no diferenciadas que lo rodean. Al crecer los folículos primordiales [fig B], aumenta el tamaño del ovocito, las células granulosas cambian de una forma plana a una cuboidal que después se multiplican por mitosis conformando varias capas alrededor del ovocito (3, 4).

Los folículos en crecimiento se clasifican en pre-antrales, antrales, preovulatorios pequeños y preovulatorios

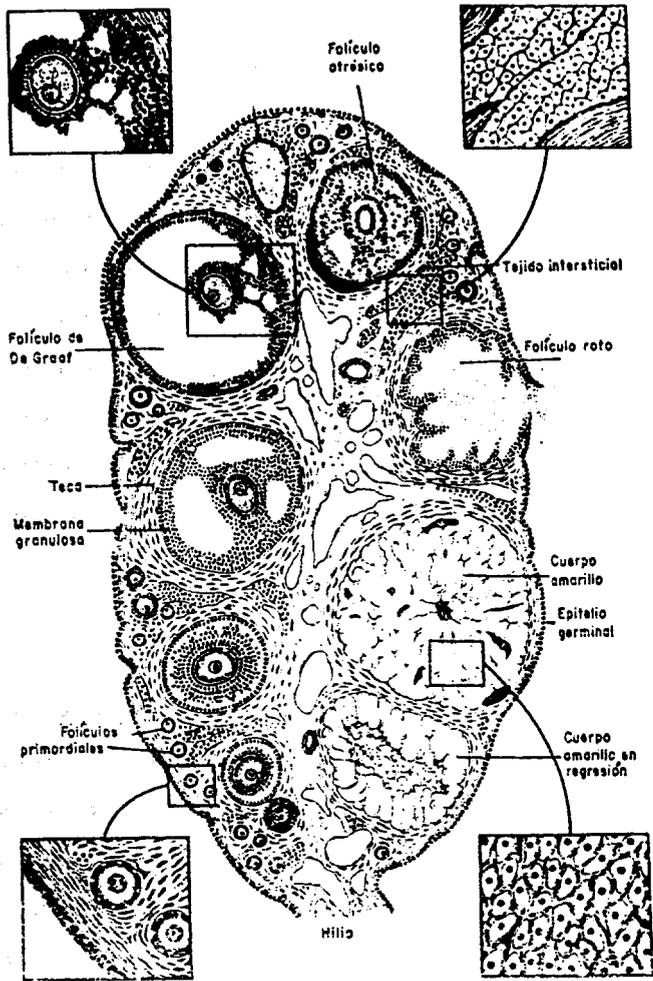


Figura A. Compartimentos en el ovario de mamíferos: El folicular, el luteal o cuerpo amarillo y el intersticial (3).

Figura B. Clasificación del desarrollo de los folículos por diámetro del ovocito y por el número de células foliculares (53).

FOLICULOS PEQUEÑOS O PRIMORDIALES

Ovocito con diámetro menor a 20 μm

Tipo 1



Tipo 2



Tipo 3a
con 20 células



FOLICULOS MEDIANOS O EN CRECIMIENTO

Ovocito con diámetro mayor a 20 μm

Tipo 3b
de 21 a 60 células



Tipo 4
de 61 a 100



Tipo 5a
de 101 a 200

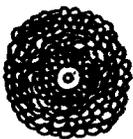


FOLICULOS GRANDES O SECUNDARIOS

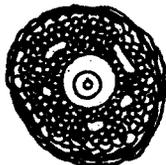
Ovocito con diámetro mayor a 70 μm

Preantrales

Tipo 5b

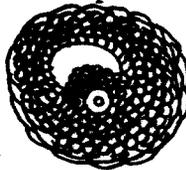


Tipo 6



Antrales o preovulatorios

Tipo 7



Tipo 8



grandes. A los folículos con más de cuatro capas de células granulosa se les considera como folículos secundarios y como preovulatorios aquellos que presentan más de ocho capas y en los cuales ya se diferencian la teca interna de la teca externa (3, 4, 7, 18). Con el avance del desarrollo, entre las células de la granulosa se forman espacios [cuerpos de "call-exner"] que contienen líquido [líquido o licor folicular], producto de la secreción de las células foliculares y de la extravasación de componentes del plasma. A medida que el folículo aumenta de tamaño, también lo hace el espacio ocupado por el líquido folicular [antro o cavidad folicular] el ovocito pasa de una posición central a una polar y se diferencian las tecas. Se considera que en esta etapa de desarrollo disminuye el proceso de mitosis de las células foliculares (4). Alrededor del ovocito existe una corona de células de la granulosa denominada corona radiada o cumulus oophorus(3, 7). Entre las células del cumulus oophorus y el ovocito existen uniones gap o nexos, cuyo número aumenta al madurar los folículos (4, 7, 74).

En el licor folicular se ha podido mostrar la presencia de: FSH, LH, PRL, OMI [factor inhibidor de la maduración del ovocito], FSHRBI [factor inhibidor de la unión de la FSH a su receptor], un polipéptido con características semejantes a la GnRH, noradrenalina, inhibina y diversos polipéptidos que son sintetizados por las células granulosas (10, 71, 76).

1.3 REGULACION DEL CRECIMIENTO Y LA DIFERENCIACION DE LOS FOLICULOS

El ovario en los animales prepúberes se caracteriza por ser un órgano en continuo crecimiento y diferenciación. Se conoce poco sobre la señal que promueve el inicio del crecimiento de los folículos primordiales, pero una vez que se inicia continúa hasta la ovulación o la atresia. Al parecer, algunos de los mecanismos que regulan los procesos para que algún(os) folículo(s) llegue a la etapa preovulatoria [folículos dominantes] dependen de: 1) la capacidad de respuesta de los folículos preantrales al estímulo gonadotrópico, 2) los factores inhibidores y estimulantes provenientes del (los) folículo(s) dominante(s) y 3) la presencia de un sistema de retroalimentación de circuito largo ["long-loop"] entre los folículos dominantes y la hipófisis (35).

Para que se lleve a cabo el proceso de foliculogénesis es imprescindible la presencia del ovocito. La ausencia del ovocito al inicio de este proceso impide la fragmentación de los cordones sexuales y por consiguiente no se forman los folículos primordiales. La destrucción selectiva de las células germinales por la administración de busulfán [1,4-butandiol dimetansulfonato] a ratas preñadas, impide la formación de los folículos. El tejido intersticial de esa gónada no presenta las características de tejido esteroideogé-

nico, ya que no se puede detectar la presencia de la enzima δ^5 - 3β -OHED'asa (43, 44, 45).

Durante la foliculogénesis, la FSH y los estrógenos placentario estimulan la síntesis de receptores a FSH en las células de la granulosa de algunos folículos preantrales. En ese momento no existen receptores a la LH en las células de la granulosa, la inducción de estos receptores por la FSH y los estrógenos ocurre al crecer y diferenciarse los folículos con antro (35, 62, 65).

Se ha sugerido que en los folículos preantrales y antrales pequeños, se sintetiza el factor IMO el cual inhibe la continuación del proceso de meiosis (10).

1.4 ACCION DE LAS GONADOTROPINAS Y LOS ESTEROIDES

Las gonadotropinas, los neurotransmisores y otras hormonas de origen central o periférico regulan la síntesis de esteroides en las células de la granulosa y de las tecas (32). En mitocondrias aisladas de ovarios de ratas inmaduras tratadas con FSH y LH, la LH estimula la síntesis de la pregnenolona, ya que facilita el movimiento del colesterol intramitocondrial al sitio dónde se segmenta la cadena principal (27).

La FSH estimula la síntesis de estrógenos en las células de la granulosa al activar al sistema de la aromatasa y como sustratos utiliza a la androstenediona y la

testosterona, que son sintetizadas por las células de la teca interna. El sistema de la aromatasa es un complejo enzimático relacionado al citocromo P450, la flavoproteína y al NADPH-citocromo P450-reductasa (20, 31, 32, 97).

Los estrógenos al actuar de manera sinérgica con la acción de la FSH, estimulan la división de las células de la granulosa y la síntesis o expresión de receptores a la FSH y a la LH (62, 63, 71).

La LH estimula la síntesis de sus propios receptores [regulación estimulante o "up-regulation"], tanto en las células de la teca como en las de la granulosa (36, 37, 64, 96). Además facilita el desarrollo de la capa de células tecaes y acelera el crecimiento de los folículos con 3 o 4 capas de células de la granulosa (53).

El reinicio de la meiosis y la maduración final del ovocito, está regulado por las células foliculares que presentan receptores a la LH. En este proceso participa el AMPc (15, 74, 75).

En la rata prepúber, se ha propuesto que al aumentar la concentración de LH en el plasma se estimula el crecimiento de los folículos con antro pequeño a folículos pre-ovulatorios. En cultivo de células de la granulosa previamente tratadas con FSH, la LH induce la síntesis de progesterona al activar al sistema 3 β -OHED'asa (27, 32, 96). La progesterona aumenta la respuesta de los folículos con

antro pequeño a la LH. Esta acción es importante en aquellos periodos en los que la concentración de LH plásmatica es baja [por ejemplo durante la pubertad, el ciclo estral y al inicio de la preñez], ya que la progesterona podría facilitar los efectos de la LH en el crecimiento de los folículos con antro pequeño a folículos preovulatorios (64).

En los folículos en crecimiento [folículos preantrales] la activación del sistema enzimático necesario para la síntesis de esteroides, es estimulado por la FSH y en los antrales por la LH. Los estrógenos promueven la proliferación celular, la inducción de receptores a PRL, a LH y al aumento del número de nexos entre las células de la granulosa (22, 32, 46).

En las ratas inmaduras hipofisectomizadas, la administración de dietilestilbestrol provoca aumento del número de folículos grandes y disminución de los folículos en crecimiento. Este hecho se ha considerado como prueba de que los estrógenos, además de su acción mitogénica, impiden que los folículos preantrales entren en atresia (46).

En la rata prepúber de 10 días, la administración de PMSG o FSH induce la aparición de folículos con antro, con diámetro mayor de 350 μm . [folículos preovulatorios], los cuales normalmente se encuentran en los ovarios de ratas de 14 a 17 días de edad (24). La administración de FSH o de la

FSH más la LH, provocan disminución de la incidencia de atresia en los folículos de 200-400 μm de diámetro y aumento de la proporción del número de los folículos preovulatorios (5, 21, 24, 28, 29, 30, 40, 56, 70, 89, 90).

1.5 ATRESIA FOLICULAR

El término atresia se refiere al proceso por el cual los folículos pierden la capacidad de continuar su diferenciación y no alcanzan la etapa de ovulación. La atresia se presenta en todos los tipos de folículos y en todas las etapas de la vida reproductiva. En el ratón, se ha calculado que durante las dos primeras semanas de vida, desaparecen de 200 a 300 folículos pequeños por día. En la rata, el número de folículos por ovario disminuye de 18000 a 5500 en las tres primeras semanas de vida. En la mujer, de los aproximadamente 400 000 ovocitos presentes al inicio de la pubertad sólo 400 ovocitos llegan a ser ovulados (6, 8).

Los signos histológicos más característicos de la atresia folicular son: detención del proceso mitótico de las células de la granulosa y disminución del índice de figuras mitóticas; separación de las células de la granulosa, algunas de éstas células aparecen en la cavidad antral [descamación] o son fagocitadas; presencia de células con núcleo picnótico; alteraciones del ovocito [ausencia o cambio en la forma de la membrana nuclear o fragmentación del ovocito]; hipertrofia de

las células de la teca [engrosamiento de las tecas], disminución del riego sanguíneo y aparición de signos de luteinización; disminución del número de nexos [uniones gap] entre las células de la granulosa y de desmosomas entre las células del cumulus y el ovocito; colapso de la zona pelúcida (3, 6, 8, 47). Otras características de los folículos atrésicos son la pérdida de la capacidad de aromatización, la de sintetizar estrógenos y posiblemente también andrógenos (8, 33, 34, 38). Sin embargo, en éstos folículos la LH y los andrógenos estimulan la producción de progesterona al activar al sistema 3β -OHED'asa (8).

2. PUBERTAD

La pubertad es la fase del desarrollo que va de la inmadurez a la madurez sexual, es regulada por el sistema hipotálamo-hipófisis-gónada y culmina cuando el ovario produce estrógenos en suficientes cantidades como para disparar el primer aumento de la secreción de las gonadotropinas y se produce la primera ovulación. La pubertad comenzaría en el momento en el que se modifican los efectos reguladores de los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas. Este cambio está asociado con la disminución en la sensibilidad del hipotálamo y de la hipófisis a los efectos inhibitorios de los estrógenos (49, 50, 58, 59, 60). Otras hormonas que modulan el proceso de la pubertad son la PRL y

la GH. La administración de PRL induce pubertad precoz en la rata, ya que aumenta la sensibilidad del ovario a las bajas concentraciones circulantes de las gonadotropinas, que existen durante el periodo prepúbereal y provoca aumento del número de los receptores a la LH en las células de la granulosa, lo que se traduce en el aumento de la liberación de la progesterona y los estrógenos. En la rata prepúbere, la PRL actúa en el hipotálamo y estimula la liberación de FSH y LH (1, 49).

En la rata el inicio de la capacidad reproductiva es señalada por la primera ovulación, evento usualmente asociado con el primer estro vaginal. Durante este proceso hay, además, dilatación e hiperemia en la área genital, aumento en el peso del útero por acumulación de líquido uterino en la etapa preovulatoria y aumento del peso de los ovarios (49).

2.1 EVENTOS NEUROENDOCRINOS DESDE EL PERIODO INFANTIL HASTA LA PUBERTAD.

Durante la maduración sexual de la rata hembra, las concentraciones de las gonadotropinas y los esteroides varían con la edad de los animales. En la rata, desde el día 5 al 15 de edad [periodo infantil], el contenido de FSH en la hipófisis se eleva drásticamente, alcanza su máximo en el día 18, permanece alta hasta el inicio del periodo juvenil [día 21] y disminuye desde el día 29 hasta el momento de la apertura vaginal [periodo pubereal]. La concentración de LH en

la hipófisis es máxima durante los días 18 al 29 de vida y disminuye al momento de la apertura vaginal (12).

En la rata de 21 días la concentración de GnRH es máxima en el hipotálamo y permanece alta hasta el momento de la apertura vaginal, momento en el que disminuye la repuesta de la hipófisis a ésta hormona, así como las concentraciones de FSH y LH en el plasma (12, 49, 72).

Durante los días que preceden a la primera ovulación aumenta la respuesta de la hipófisis a los estrógenos circulantes, siendo máxima cuando aumenta la concentración de las gonadotropinas en el plasma (41, 49, 51, 58, 60, 72).

En el animal prepúber la liberación de la FSH es continua y la de LH es episódica. Entre el día 10 y 15 de vida las concentraciones plasmáticas de la FSH están elevadas, disminuyen hacia el día 20 y permanecen bajas hasta el momento de la apertura vaginal y el primer estro (14, 16, 42, 58, 77). En los animales de 13 a 18 días de edad, las concentraciones más elevadas de LH ocurren entre las 15:00 y 03:00 hs (24). En la tarde del primer proestro vaginal, se produce un aumento brusco de las concentraciones plasmáticas de la LH y FSH (78, 85).

En el día de la apertura vaginal aumentan las concentraciones plasmáticas de la FSH, aumento similar al que ocurre en la tarde del proestro en el animal adulto (12).

En los ovarios de la rata, a los 10 días de edad [periodo infantil], existen receptores a la GnRH y a las gonadotrópinas [FSH y LH]. La máxima concentración de los receptores a la GnRH coincide con la disminución de las concentraciones plasmáticas de la FSH (14). Al disminuir el número de receptores a GnRH en el ovario se estimula el proceso de esteroidogénesis y la activación de los mecanismos que controlan a la pubertad (72).

En las células de la granulosa sólo existen receptores a FSH y su número aumenta con la edad hasta el día 21 [inicio del periodo juvenil]. La unión de la FSH a su receptor coincide con el desarrollo de los folículos que tienen de 1 a 3 capas de células granulosas. La unión de LH-hCG a sus receptores se encuentra exclusivamente en las células intersticiales hasta la edad de 20 días, después del día 25 estos aparecen en las células de la granulosa y de la teca en los folículos con antro (24, 77, 78, 96). La presencia de los receptores a FSH en las células de la granulosa entre el día 20 y primer proestro vaginal asegura un desarrollo folicular permanente y la inducción de la actividad del complejo P450-aromatasa. La aparición de los receptores a LH, en las células del intersticio ovárico en el día 10 de edad, coincide con la capacidad del ovario para secretar estradiol (42, 65, 78).

En las células de la granulosa de los folículos preantrales existen receptores a PRL, cuyo número disminuye al crecer el folículo, a pesar de que se mantiene la afinidad a la hormona (1). Con base en estos hallazgos, se ha sugerido que la presencia de altas concentraciones plasmáticas de la PRL en la rata prepúber después del día 20 de edad, facilita el desarrollo folicular e induce la formación de receptores a LH en las células de la granulosa. Sin embargo, si la concentración de PRL aumenta después de la ovulación, los animales entran en diestro permanente y no vuelven a ovular (1).

En la rata prepúber mayor de 21 días la administración de PMSG o de estrógenos, inducen la liberación de la LH 48 a 60 horas después del tratamiento y la ovulación entre 10 a 12 horas más tarde (52, 57, 67, 68, 69, 92, 95).

En la rata de 24 días, la administración de PMSG induce aumento de la concentración plasmática de estradiol y del número de receptores a estradiol y progesterona en el ovario y el útero. La administración de hCG después de la PMSG, provoca aumento del peso de los ovarios, aumento en la concentración plasmática de progesterona, disminución de la concentración de estradiol, ovulación y luteinización (2).

En la rata de 28 días la administración de PMSG induce la ovulación a las 72 horas (25). Cuando son inyectados con

benzoato de estradiol [BE] 48 horas después de la PMSG aumenta el número de ovocitos liberados y si se administra hCG 48 horas después de la PMSG el número de ovocitos es similar al de los animales tratados con sólo PMSG (26).

En ratas de 30 días la administración de PMSG [8 u.i.] provoca, ocho horas después, aumento de la producción de esteroides [17 α -hidroxiprogesterona, dihidroepiandrosterona, testosterona, androstenediona y estradiol]. En el día 32 [48 horas después de la PMSG] aumentan las concentraciones plasmáticas de la FSH y LH, disminuyen las de estradiol así como el número de receptores a estrógenos en el hipotálamo y la hipófisis. A las 72 horas [día 33] se induce la apertura vaginal, el primer estro vaginal y la ovulación. En este momento las concentraciones de las gonadotropinas disminuyen, aumenta el número de receptores a estrógenos y sólo las concentraciones de progesterona permanecen elevadas hasta el día 34 [96 horas después de la PMSG] (52).

3. HORMONA ESTIMULANTE DEL FOLICULO Y SUS ISOHORMONAS.

La FSH es sintetizada en las células basófilas de la adenohipófisis y liberada por exocitosis a la circulación, mecanismo que implica cambios en la permeabilidad de la membrana celular en respuesta al flujo de calcio a través de la misma (11). La secreción y síntesis de esta gonadotropina está regulada por la GnRH hipotálmica que llega a la

hipófisis por el sistema porta hipotálamo-hipofisario y que está bajo el control de transmisores nerviosos provenientes de diferentes regiones extrahipotálamicas e hipotálamicas. Los estrógenos, andrógenos, progéstagenos e inhibina estimulan o inhiben la liberación de la FSH (18, 50, 61).

La FSH es una glucoproteína formada por dos subunidades, la cadena alfa y beta [α y β]. Las dos cadenas de polipéptidos glucosiladas están unidas por enlaces no covalentes. La estructura de la cadena α , presenta una secuencia de 89 a 92 aminoácidos y es homóloga a la subunidad α de las tres hormonas glucoprotéicas producidas por la adenohipófisis [FSH, LH y la hormona estimulante de la tiroides (TSH)] y a la hCG producida por la placenta. Presenta dos cadenas de carbohidratos, unidas a los residuos de aspargina, una de ellas se encuentran en la posición 52 y la otra en la 78. La subunidad β , consta de 118 aminoácidos, tres residuos de asparagina en posición 1, 7 y 24, y también presenta dos cadenas de carbohidratos unidas a residuos de asparagina que se encuentran en las dos últimas posiciones. Esta subunidad varía en las diferentes hormonas hipofisarias y se considera que cada una de ellas presenta una determinada especificidad biológica. Los carbohidratos que se incorporan a los aminoácidos son: manosa, N-acetilglucosamina, galactosa y ácido siálico. El peso molecular de FSH es aproximadamente de 30000 daltones (11).

En la hipófisis anterior de varios mamíferos incluyendo al humano, se ha demostrado la existencia de múltiples formas o tipos moleculares de las gonadotropinas. Este polimorfismo ha sido demostrado por el uso de técnicas de fraccionamiento tales como filtración en gel, cromatografía de afinidad [unión de FSH a la Concanavalina-A, proteína vegetal que posee la propiedad de unir específicamente residuos de carbohidratos], isoelectroenfoque y cromatoenfoque, técnicas que separan a las diferentes FSH en función de su punto isoeléctrico [pI] (79, 80, 82).

Se ha propuesto que los residuos de ácido siálico y los oligosacáridos incorporados a las cadenas de amino ácidos de la FSH regulan la actividad biológica de la hormona. A mayor incorporación de residuos de ácido siálico en la molécula, aumenta el tiempo de permanencia de la FSH en la circulación, pero su actividad biológica es menor que las formas con menor contenido de ácido siálico [isohormona tipo básico]. También se modifica su capacidad de unión al receptor, ya que su afinidad disminuye al aumentar el número de residuos de ácido siálico (11, 81).

Experimentalmente se ha demostrado que al exponer a la hipófisis a estradiol o a la GnRH, aumenta la producción de las formas básicas. Al parecer, este efecto depende de la estimulación directa o indirecta de las enzimas hipofisarias que participan en el proceso de sialización (84). Mientras la

GnRH potencia la glucólisis de las cadenas de carbohidratos, el estradiol además de potenciar la glucólisis reduce la incorporación de los residuos de ácido siálico en la molécula de FSH y la testosterona aumenta la incorporación de estos residuos (82, 91).

Durante la etapa de baja actividad gonadal [antes del inicio de la pubertad] o después de castrar a los animales, en la hipófisis existe una proporción aumentada de formas de FSH que contienen más residuos de ácido siálico [isohormona tipo ácida], y las cuales presentan una vida media más prolongada en el plasma. En estudios in vitro, estas formas ácidas presentan menor actividad biológica que las isohormonas menos ácidas. En cambio, cuando la actividad gonadal es alta, en la hipófisis existe una mayor proporción de formas menos ácidas (11, 12).

En la rata existe diferencia sexual en la concentración de las diversas isohormonas hipofisarias: mientras que en la hipófisis anterior de la hembra peripúber y adulta [sacrificadas en el día de la apertura vaginal espontánea o antes del pico preovulatorio de la LH] es mayor la proporción relativa de isohormonas menos ácidas, en el macho peripúber alrededor del día 40 de edad [cuando se detecta la presencia de espermatozoos en los túbulos seminíferos], es menor la proporción de éstas isohormonas (12, 82, 83).

En la hipófisis de ratas hembra prepúberes se han detectado siete tipos de FSH y en el adulto sólo seis, la

séptima especie tiene un pI de 4.2. Antes de la apertura vaginal, la mayoría de las isohormonas migran hacia la porción ácida del gel de policrilamida [con pI de 4.2-3.8]. Después, mientras disminuyen las isohormonas que tienen un pI de 3.9-3.49 [tipo ácido], aumentan las isohormonas con pI de 6.0-5.0 [tipo básico] (12).

II. PROPOSITO DEL TRABAJO

Dado que durante la maduración sexual de la rata, ocurren varios eventos neuroendócrinos a nivel central y en las gónadas, que la capacidad de respuesta al estímulo gonadotrópico y esteroideo está en función de la edad de los animales, que la síntesis y secreción de las diferentes isohormonas de la FSH varía desde la etapa infantil hasta la pubertad y que se conoce poco sobre la acción de las diferentes isohormonas en los procesos de la foliculogénesis en las gónadas de animales prepúberes y adultos, se decidió estudiar los efectos biológicos de las isohormonas de la FSH sobre el crecimiento y la diferenciación folicular, utilizando como modelo experimental a la rata hembra prepúber de 21 a 30 días de edad.

III. HIPOTESIS

La regulación del crecimiento y la diferenciación folicular, la capacidad de respuesta del ovario a las gonadotropinas y a las isohormonas de la hormona estimulante del foliculo varían con la edad del animal en estudio.

OBJETIVOS

- Determinar si en la rata prepúber, la capacidad de respuesta del ovario a las gonadotropinas varía con la edad del animal.
- Determinar si el desarrollo de los folículos está en función de la edad y del tiempo transcurrido después de la administración de las gonadotropinas.
- Analizar los efectos de las gonadotropinas sobre la proporción de folículos sanos y atrésicos.
- Proponer un modelo experimental, para analizar los efectos de las isohormonas de la FSH sobre el crecimiento y la diferenciación de los folículos.

IV. MATERIALES Y METODOS

Se utilizaron ratas hembras prepúberes de la cepa CIIZ-V, mantenidas en condiciones de luz-oscuridad controladas [luces encendidas de las 05:00-19:00 h], con libre acceso al agua, al alimento y a la madre. A la edad de 10 días, los animales fueron separados por sexo y camadas de 6 a 8 hembras se mantuvieron con sus madres hasta el día del sacrificio. Todos los tratamientos hormonales se realizaron por vía subcutánea, excepto la administración de fenobarbital que fue por vía intraperitoneal.

Procedimiento de autopsia y procesamiento de los ovarios.

Los animales fueron sacrificados por decapitación. A la autopsia se extrajeron y pesaron los ovarios y el útero. En las trompas se buscó la presencia de ovocitos, los que fueron contados con ayuda de un microscopio estereoscópico. En los animales que abrieron vagina se tomaron frotis. Los ovarios fueron fijados en solución de Bouin, incluidos en parafina, se realizaron cortes seriados de 10 μm , los que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. El análisis de la distribución folicular se realizó siguiendo la metodología habitual del laboratorio (9) y la propuesta por Braw and Tsafiriri (5). Se consideraron como folículos atrésicos, aquellos que presentaron alguna de las siguientes características: más de cinco figuras de picnosis en las células de la granulosa,

engrosamiento de la teca interna, alteraciones del ovocito, presencia de células de la granulosa en el antro folicular.

Experimento 1. Estudio de la respuesta ovulatoria al estímulo gonadotrópico en función de la edad de los animales.

Ratas de 21, 24, 27 y 30 días de edad fueron inyectadas a las 15:00 h, con 3, 6 o 8 ui de PMSG [Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo., E.U.A.] o 0.1 ml de solución salina [Vehículo: NaCl al 0.9 %]. Los animales fueron sacrificados a las 72 horas. Como grupo testigo se utilizaron ratas sin tratamiento que fueron sacrificadas en el día de la apertura vaginal espontánea.

Experimento 2. Capacidad ovulatoria del ovario en respuesta al tratamiento con gonadotropinas.

Ratas de 21, 24, 27 y 30 días de edad, fueron sometidas a los siguientes tratamientos y sacrificadas a las 24, 48 y 72 horas después de recibir el primer tratamiento:

- A.- Vehículo [grupo testigo]
- B.- 2.5 ui de hCG [Gonadotropl, Roussell de México]
- C.- 3.0 ui de PMSG
- D.- 3.0 ui de PMSG y 3 horas después 2.5 ui de hCG.

En otro experimento, ratas de 21, 24 y 27 días de edad fueron inyectadas con 3 ui de PMSG y 48 horas después con 2.5 ui de hCG o 3.7 µg/Kg de gonadoliberina [GnRH: Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo. EUA]. Ratas de 24 días de edad fueron tratadas con 6 ui de PMSG y 48 horas después con 5 ui

de hCG. Todos los animales fueron sacrificados 72 horas después de haber sido inyectados con la PMSG.

Experimento 3. Análisis neuroendócrino de la inducción de la ovulación por el tratamiento con PMSG

Para analizar los procesos neuroendócrinos que regulan a la ovulación estimulada por el tratamiento con PMSG, se utilizó la prueba del bloqueo ovulatorio provocado por la administración de fenobarbital sódico [barbiturico que bloquea la liberación de GnRH (84) y de la FSH (25, 30)].

La dosis efectiva del barbiturico fue determinada en ratas adultas cíclicas, de 90 días de edad, que fueron inyectadas, una sola vez, a las 13:00 o las 15:00 h en el día del proestro con diferentes dosis de fenobarbital [ENEP-Zaragoza, U.N.A.M., México].

Bloqueo ovulatorio inducido por la administración de fenobarbital y efectos del reemplazo hormonal

Ratas de 27 días inyectadas a las 15:00 h con 3 o 6 ui de PMSG, fueron divididas en los siguientes grupos:

- A.- Sacrificadas a las 72 horas [grupo testigo].
- B.- Inyectadas con fenobarbital [100 mg/kg] a las 48 h y sacrificadas 24 horas después.
- C.- Inyectadas con fenobarbital a las 48 horas, después de 3 h con 10 ui de hCG o con 3.7 µg/Kg de GnRH y sacrificadas 21 h después.

Experimento 4. Estudio de las modificaciones de la población folicular inducidos por la administración de PMSG a diversas edades.

En este experimento se analizó la distribución de la población folicular y el número de folículos que presentaron los signos de atresia antes mencionados. Sólo se utilizaron los ovarios, extraídos del lado derecho, de las ratas de 21, 24 y 27 días que fueron inyectadas con 3 u.i. de PMSG o con solución salina a las 15:00 h y sacrificadas a las 24, 48 y 72 horas.

Experimento 5. Estudio de los efectos de dos isohormonas de la FSH de rata sobre el desarrollo folicular y la ovulación

Con base a los resultados obtenidos en los experimentos anteriores, se decidió que el modelo experimental más apropiado, para estudiar la actividad biológica de las isohormonas de la FSH sobre el crecimiento y la diferenciación folicular, fuese el de la rata de 24 días y sacrificada a las 48 horas después del tratamiento (86). En estos animales la administración de PMSG provocó aumento en la proporción de los folículos con diámetro de 170-369 μm y disminución de los folículos atrésicos con diámetro mayor de 350 μm . Además a las 48 horas, en estos y en los demás animales sometidos al mismo tratamiento, aumentó el peso del útero. Como modelo para analizar su capacidad de inducir la ovulación se seleccionó al animal de 27 días de edad sacrificado a las 72 horas.

Las isohormonas de la FSH de ratas [rFSH] fueron obtenidas a partir de las hipófisis de ratas machos adultos, después de 30 días de haber sido castrados. La separación de las isohormonas fue realizada por el Biol. Pablo Damian-Matsumura, en el Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de la Nutrición, Salvador Zubirán, siguiendo la metodología de Ulloa-Aguirre y col. (80).

Para el presente estudio se utilizaron dos isohormonas inmunoactivas denominadas rFSH-A y rFSH-B. La rFSH-A correspondió a las formas moleculares cuyos puntos isoeléctricos se encuentran entre 7.40 y 4.90, [isohormona tipo básico] y la rFSH-B entre 4.89 y 4.00 [isohormona tipo ácido] (fig C). El contenido de ácido siálico incorporado a la molécula es menor en la isohormona tipo básica que en la rFSH-B (81, 82).

Efecto de las isohormonas de la FSH sobre el crecimiento y diferenciación folicular

Ratas de 24 días fueron inyectadas a las 15:00 h con vehículo, rFSH-A o rFSH-B inmunoactivas (200 ng/animal) y sacrificadas 48 horas después. A la autopsia, se disecaron y pesaron los ovarios y útero. Los ovarios fueron procesados como en los grupos anteriores.

Capacidad inductora de la ovulación por las isohormonas

Debido a que en los animales de 24 días, la administración de rFSH-A provocó aumento del número de los

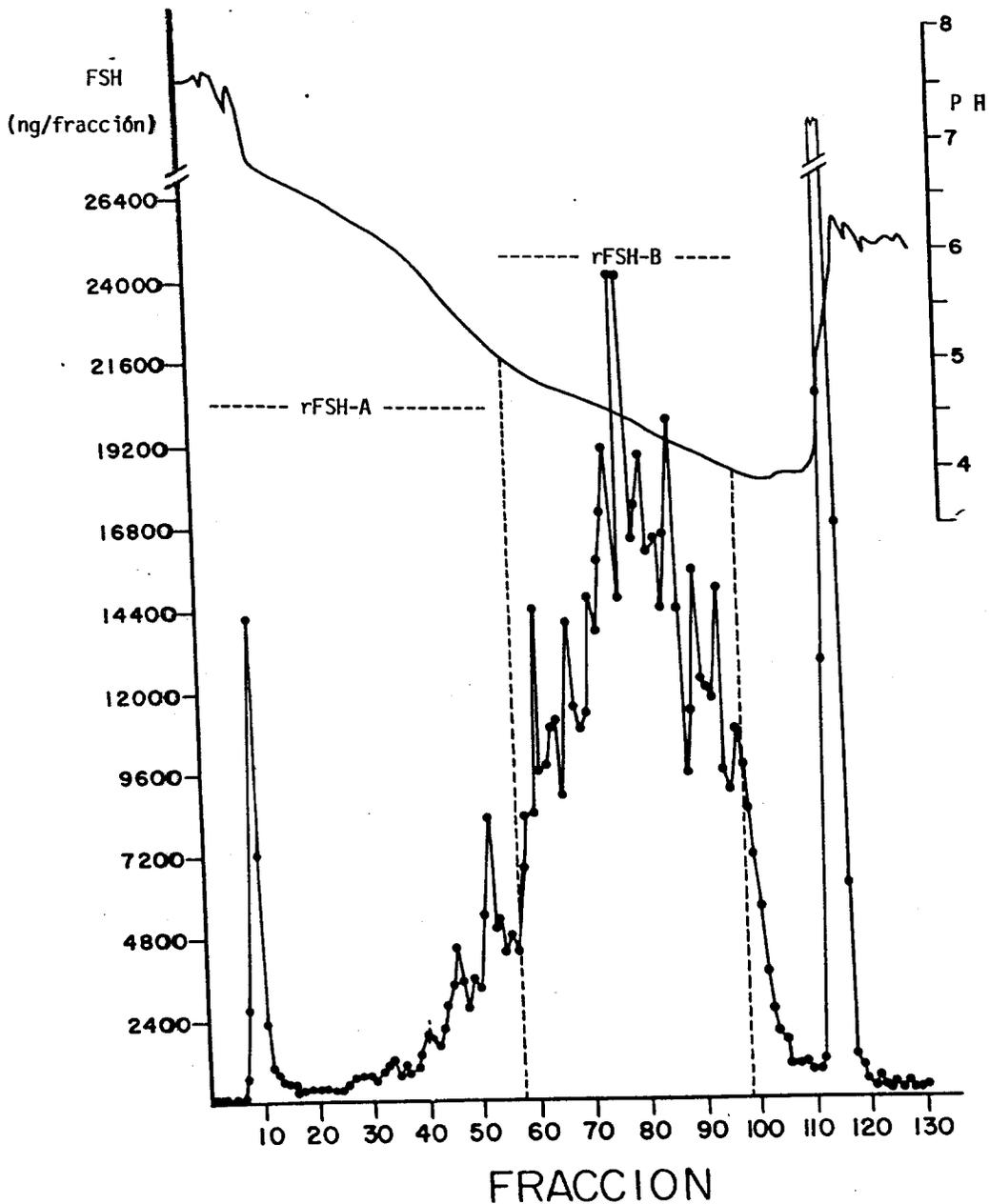


Figura C. Representación del perfil de distribución en función del pH de la FSH inmunoreactiva por cromatoenfoque, obtenida de hipófisis de rata macho adulta castrada

folículos atrésicos con diámetro mayor de 350 μm , se decidió aumentar la dosis de administración de la isohormona rFSH-B cuyo contenido de ácido siálico es mayor.

En este estudio ratas de 27 días fueron inyectadas con 200 o 400 ng de rFSH-B y sacrificados 72 horas después. El procedimiento de autopsia fue similar a lo descrito con anterioridad.

Análisis estadístico de los resultados

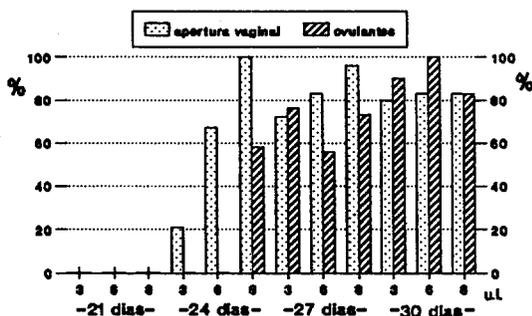
Los resultados del peso de los ovarios y del útero, el número de ovocitos liberados y el diámetro folicular fueron analizados por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA) seguido de la prueba de Duncan. La tasa de animales ovulantes, de útero distendido y de apertura vaginal, la distribución de los folículos y el número de folículos, por la prueba de ji cuadrada, la "t" de student o de probabilidad exacta de Fisher. En todos los casos se aceptaron como significativas, aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor al 5%.

V. RESULTADOS

1. Estudio de la respuesta ovulatoria al estímulo gonadotrópico en función de la edad de los animales.

La tasa de animales que mostraron canalización vaginal y que ovularon, a las 72 horas, en respuesta a la administración de PMSG, dependió de la edad de los animales y de la dosis empleada (fig. 1). Los animales tratados a los 21 días, con 3, 6 o 8 ui de PMSG, no presentaron apertura vaginal, ni ovulación; los animales inyectados a los 24 días abrieron vagina de manera diferencial cuya tasa aumentó con la dosis utilizada [con 3 u.i: 3/14; 6 ui: 4/6; 8 ui: 12/12] y sólo ovularon aquellos tratados con 8 ui de PMSG [7/12 ovularon].

Fig 1 Tasa de ratas ovulantes y apertura vaginal, 72 horas después de inyectarles PMSG en diferentes edades.

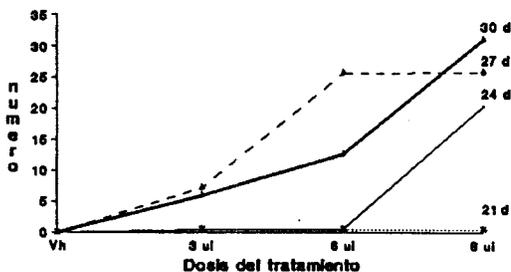


En los animales de 27 y 30 días, el tratamiento hormonal indujo apertura vaginal y ovulación en forma semejante para todas las dosis utilizadas. En los animales

que abrieron vagina, la tasa de animales ovulantes fue mayor que la observada en los testigos con apertura vaginal espontánea donde sólo 1 de 10 animales ovuló.

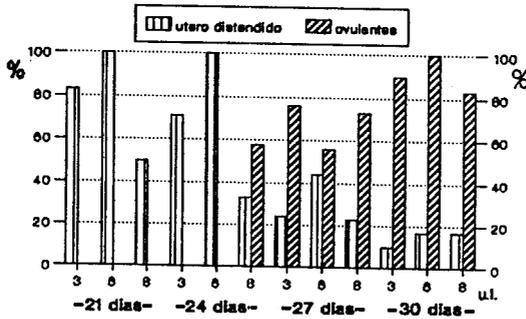
El número de ovocitos liberados por animal ovulante, también fue función de la edad y las dosis utilizadas (fig 2) Los animales de 24 días cuando ovularon, presentaron poliovulación [20.3 ± 2.6 ovocitos por animal ovulante]; en los de 27 días tratados con 3 ui de PMSG, el número de ovocitos liberados fue similar al de los animales testigo con ovulación espontánea [7.1 ± 0.6 vs 8 ovocitos] y en los tratados con 6 y 8 ui se presentó poliovulación [25.7 ± 2.3 y 25.8 ± 1.4]. En los animales de 30 días, se observó una respuesta lineal del número de ovocitos liberados en función de la dosis de PMSG [5.9 ± 0.4 ; 12.7 ± 2.3 y 30.0 ± 1.6].

Fig 2. Numero de ovocitos liberados por animal ovulante en ratas de 21, 24, 27 y 30 días, 72 horas despues de la PMSG.



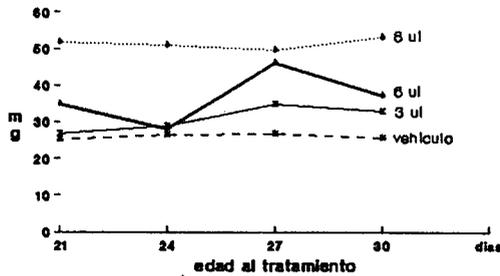
La tasa de animales que presentaron útero distendido, mostró una relación inversa al del número de animales ovulantes (fig 3), debido a que la mayoría de los animales que no ovularon presentaron útero distendido al momento de la autopsia.

Fig 3. Tasa de ratas ovulantes y con útero distendido, 72 horas después de inyectarles PMSG en diferentes edades.



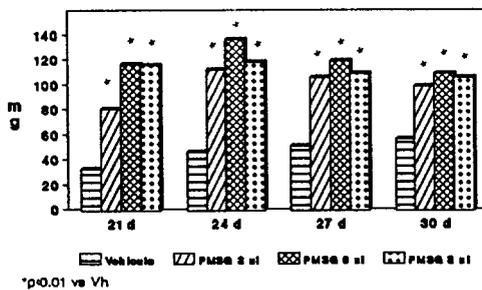
En la mayoría de las ratas tratadas con PMSG, el peso de los ovarios aumentó de manera significativa en relación a las inyectadas con el vehículo (fig 4) y con las autopsiadas a la apertura vaginal espontánea [21.0±1.6]. En los animales de 21 y 24 días, los ovarios aumentaron de peso sólo en los tratados con 8 ui, mientras que en las ratas de 27 y 30 días tratadas con 3, 6 y 8 ui de PMSG, el peso aumentó en función de la dosis utilizada. El peso de los ovarios fue similar en todos los grupos tratados con 8 ui.

Fig 4. Peso de los ovarios de ratas de 21, 24, 27 y 30 días, tratadas con PMSG y autopsiadas a las 72 horas.



El peso del útero aumentó significativamente en todos los animales tratados con PMSG (fig 5), respuesta que no dependió de la edad, ni de la dosis inyectada. Sin embargo,

Fig 5. Peso del útero de ratas de 21, 24, 27 y 30 días, después de 72 horas de haber sido tratadas con PMSG.



el peso del útero fué menor que en los animales testigo absoluto, autopsiados en el día de la apertura vaginal espontánea [176.0±15.2].

2. Capacidad ovulatoria del ovario en respuesta al tratamiento con gonadotropinas.

2.1. Efectos de la administración de hCG, PMSG o PMSG-hCG en función de la edad al tratamiento y el lapso antes de la autopsia

En los animales de 21, 24, 27 y 30 días, la administración de hCG no indujo apertura vaginal, ni ovulación a las 24, 48 y 72 horas del tratamiento. Sólo el grupo de ratas inyectadas a los 30 días y sacrificadas a las 48 horas, presentaron útero distendido [Vh: 0/6 vs hCG: 5/6, $p < 0.01$].

El tratamiento con PMSG-hCG no indujo ovulación ni apertura vaginal en los animales autopsiados a las 24 o 48 horas. En los animales de 21 días, sacrificados a las 48 horas, aumentó el número de ratas con útero distendido en comparación con los que sólo recibieron PMSG (4/6 vs 0/6, $p < 0.05$) (fig.7)

En los animales tratados con PMSG-hCG, sacrificados a las 72 horas, tampoco se modificó la tasa de animales ovulantes (fig 6) ni la de útero distendido (fig 7), aunque fue menor la proporción de animales que presentaron apertura vaginal (fig. 6). En las ratas de 30 días el número de ovocitos liberados por animal ovulante aumentó en comparación con los tratados con PMSG, lo que no ocurrió en las tratadas a los 27 días (tabla 1)

Fig 6. Tasa de ratas con apertura vaginal y ovulantes, 72 h despues de haber sido tratadas con PMSG o PMSG+hCG.

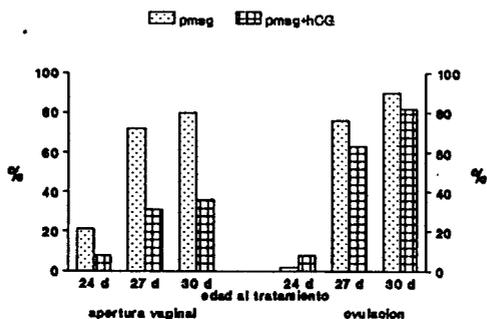
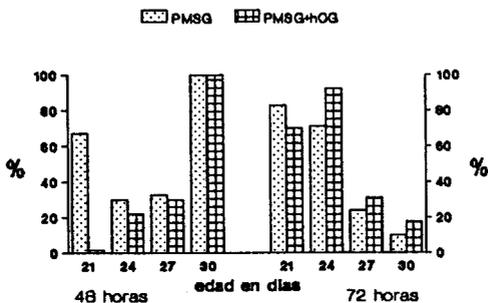


Fig 7. Tasa de ratas con utero distendido 48 y 72 horas despues de haber sido tratadas con PMSG o PMSG+hCG

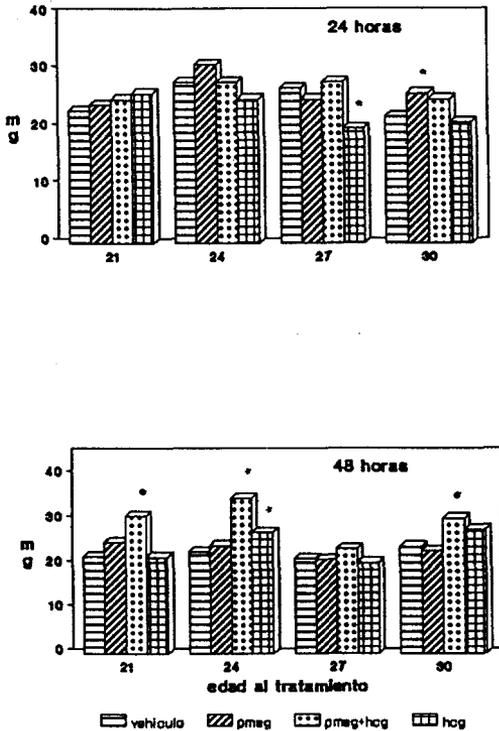


El peso de los ovarios de los animales de 21, 24 y 27 días tratados con 3 ui de PMSG, autopsiados a las 24 y 48 horas, fue similar al grupo testigo, mientras que en los de 30 días se observó un aumento significativo a las 24 horas, el que desapareció a las 48 horas (fig.8); a las 72 horas el

peso aumentó sólo en los animales de 27 y 30 días (tabla 1).

El tratamiento con hCG no afectó el peso de los ovarios en los animales de 21 días, tratados o no con PMSG, excepto en el grupo inyectado con PMSG-hCG, sacrificado 48 horas, en el que se observó un aumento significativo que desapareció 24 horas después (fig.8, tabla 1).

Fig 8. Peso de los ovarios de ratas de 21 a 30 días, después de 24 o 48 horas de inyectarles Vh, PMSG, PMSG+hCG o hCG.



*p < 0.05 vs vehículo

Tabla 1. Mediate.e.m. del número de ovocitos liberados por animal ovulante, peso de los ovarios y útero (mg), de ratas de 21, 24, 27 y 30 días de edad inyectadas con Vehículo, PMSG (3 u.i.) o PMSG + hCG, sacrificadas 72 horas después del primer tratamiento.

Tratamiento	Vh	hCG	PMSG	PMSG+hCG
Edad :		Número de ovocitos		
21 días	0	0	0	0
24 días	0	0	0	9
27 días	0	0	7.1±0.6	6.4±0.7
30 días	0	0	5.9±0.4	8.2±0.6**
Ovarios				
21 días	25.2±3.0	22.6±1.2	26.8±3.3	26.7±1.7
24 días	26.5±1.4	33.6±2.2#	29.0±2.0	28.2±0.9
27 días	26.7±1.5	24.7±1.7	34.8±1.1*	29.2±1.5
30 días	25.8±1.1	22.0±0.8#	33.0±1.2*	28.8±1.3
Utero				
21 días	34.8±3.0	67.6±3.5*	81.9±8.9*	123.6±6.1*
24 días	46.9±3.8	79.9±3.6*	112.9±5.4*	135.7±8.6*
27 días	51.5±4.2	102.4±3.0*	106.5±2.8*	118.5±5.5*
30 días	57.2±2.3	91.6±8.1*	100.2±8.3*	125.1±10.2*

* p<0.01 y # p<0.02 vs Vehículo; ** p<0.01 vs PMSG (ANDEVA seguida de la prueba de Duncan)

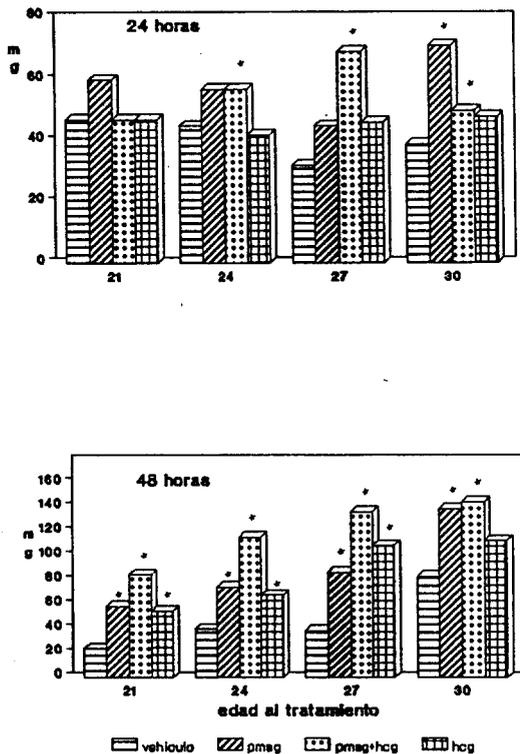
El peso de los ovarios de los animales de 24 días, aumentó a las 48 y 72 horas de la administración de hCG. En cambio, el peso ovárico disminuyó en los animales de 27 y 30 días sacrificados a las 24 y 72 horas respectivamente (fig.8, tabla 1). El tratamiento con hCG potenció los efectos de la PMSG en los animales de 24 y 30 días sacrificados a las 48 horas (fig 8).

En los animales de 21, 24 y 27 días tratados con PMSG o hCG, el peso del útero aumentó de manera significativa a las 48 y 72 horas. En cambio, en los animales de 30 días el

aumento se observó a las 24, 48 y 72 horas después de la inyección de PMSG y 72 horas después de hCG (fig 9, tabla 1)

En la mayoría de los animales inyectados con PMSG, la administración de hCG potenció el aumento del peso del útero, mientras que en las ratas de 21 días el aumento se encontró a las 48 y 72 horas; en los de 24, 27 y 30 días el efecto ocurrió a partir de las 24 horas (fig. 9, tabla 1).

Fig 9. Peso del útero en ratas de 21 a 30 días, después de 24 o 48 horas de inyectarles Vh, PMSG, PMSG+hCG o hCG.



*p<0.05 vs vehículo

2.2. Efectos de la administración de hCG o GnRH, 48 horas después de la inyección de PMSG.

En los animales de 21 días tratados con 3 ui de PMSG, que recibieron 2.5 ui de hCG o 3.7 µg de GnRH 48 horas después de la PMSG, no se observaron diferencias en la tasa de ratas con canalización vaginal u ovulación, aunque dos de los seis animales tratados con GnRH ovularon, pero el número de ovocitos liberado fue muy bajo (fig. 10, tabla 2).

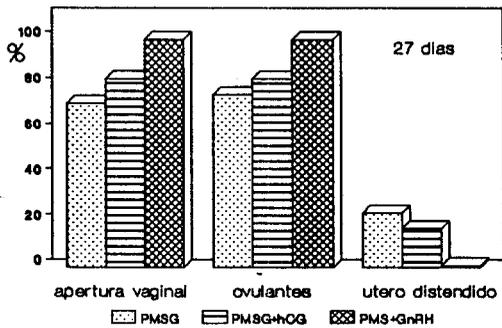
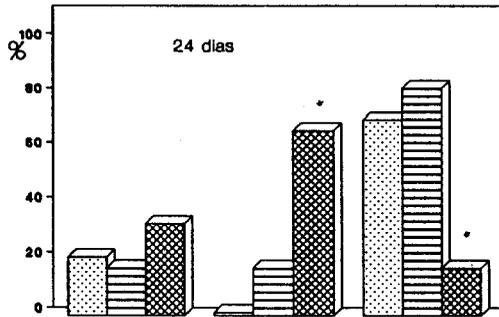
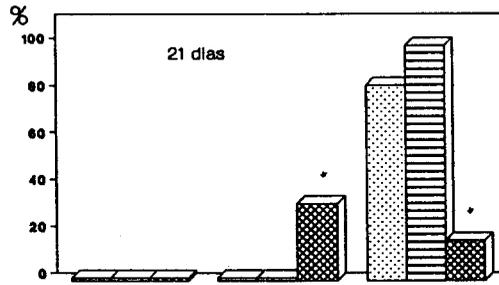
El número de animales con útero distendido disminuyó en los grupos de ratas que recibieron GnRH, comparado con los tratados con PMSG y con hCG (fig 10).

En los animales de 24 días, el tratamiento con GnRH aumentó la tasa ovulatoria pero no la de apertura vaginal y sólo uno de seis animales presentó útero distendido, mientras que en los animales de 27 días no se modificó la respuesta provocada por la administración de PMSG. El tratamiento con hCG [2.5 ui], en las tres edades estudiadas, tampoco modifico estos parámetros, comparado con el grupo que recibió sólo PMSG.

El número de ovocitos liberados por animal ovulante fue semejante en las ratas de 24 y 27 días sometidas a los mismos tratamientos (tabla 2).

En las ratas de 24 días tratadas con 6 ui de PMSG y 5 ui de hCG, aumentó la tasa de animales ovulantes [con 2.5 ui: 1/6 vs con 5 ui: 5/6, $p < 0.05$] y el número de ovocitos

Fig 10. Comparacion de la respuesta ovulatoria, apertura vaginal y utero distendido inducida por gonadotropinas



* p < 0.05 vs PMSG

liberados [GnRH: 6.0 ± 1.2 y con hCG 2.5 ui: 9 vs hCG 5 ui: 12.0 ± 1.6 , $p < 0.01$]; disminuyó la tasa de ratas con útero distendido [con 2.5 ui: 5/6 vs con 5 ui: 0/6, $p < 0.01$] y no se modificó la tasa de animales con apertura vaginal [2.5 ui: 1/6 vs 5 ui: 3/6].

Tabla 2. Mediate.e.m. del número de ovocitos por animal ovulante, peso de los ovarios y útero (mg) de ratas de 21, 24 y 27 días de edad inyectados con PMSG (3 u.i.), 48 h después con 2.5 u.i. de hCG o 3.7 $\mu\text{g/Kpc}$ de GnRH y sacrificados a las 72 horas del tratamiento con PMSG

Edad	21 días	24 días	27 días
Tratamiento	Número de ovocitos		
PMSG	0	0	7.1 ± 0.6
PMSG + hCG	0	8	7.2 ± 1.0
PMSG + GnRH	2.0 ± 1	6.0 ± 1.2	6.2 ± 0.8
	Ovarios		
PMSG	26.8 ± 3.3	29.0 ± 2.0	34.8 ± 1.1
PMSG + hCG	29.6 ± 0.8	28.2 ± 1.1	35.4 ± 1.6
PMSG + GnRH	26.5 ± 1.4	25.4 ± 1.1	$26.8 \pm 0.7^*$
	Utero		
PMSG	81.9 ± 8.9	112.9 ± 5.4	106.5 ± 2.8
PMSG + hCG	$116.7 \pm 4.2^*$	122.4 ± 7.1	118.2 ± 7.2
PMSG + GnRH	88.5 ± 4.9	$96.3 \pm 3.2^\#$	110.6 ± 7.4

* $p < 0.001$ y $\# p < 0.02$ vs PMSG (ANDEVA seguida de la prueba de Duncan).

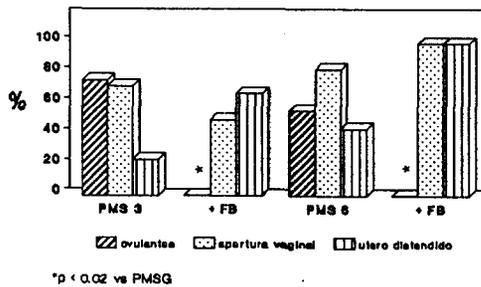
El peso de los ovarios en los animales de 27 días tratados con PMSG y GnRH fue menor que el de los tratados sólo con PMSG (tabla 2). En los de 24 días, el peso fue mayor en los tratados con PMSG [6 ui] y hCG [5 ui] [42.9 ± 0.4 vs hCG 2.5: 28.2 ± 1.1 y GnRH: 25.4 ± 1.1 , $p < 0.01$].

En los animales de 21 días, el aumento del peso del útero inducido por la PMSG fue potenciado por la inyección de hCG (tabla 2). En los animales de 24 días, tratados con GnRH el peso del útero fué menor que en los demás grupos (tabla 2) y el peso fué similar al del grupo que recibió la dosis mayor de PMSG y hCG [GnRH: 96.3±3.2 vs hCG 5 ui: 100.0±4.3].

3. Análisis neuroendócrino de la inducción de la ovulación por el tratamiento con PMSG

La administración de fenobarbital a ratas de 27 días bloqueó la ovulación inducida por la administración de 3 o 6 ui de PMSG, aumentó la proporción de animales que presentaron útero distendido y no se modificó la de apertura vaginal (fig 11).

Fig 11 Tasa de ratas ovulantes, apertura vaginal y útero distendido. Tratadas con 3 o 6 ui de PMSG y 48 h después con FB

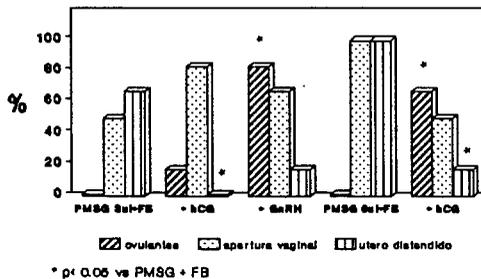


En los animales tratados con 3 ui de PMSG, el bloqueo de la ovulación no fue eliminado por la inyección de hCG, pero sí por la de GnRH (fig 12). En los inyectados con 6 ui de PMSG, el bloqueo fue eliminado por la administración de

hCG, aunque el número de ovocitos liberados por animal ovulante fue menor que en los animales tratados sólo con PMSG (fig. 12, tabla 3).

El número de ratas con útero distendido disminuyó en las tratadas con hCG o GnRH, mientras que no se modificó la tasa de apertura vaginal (fig 12).

Fig 12. Tasa de ovulantes, de apertura vaginal y útero distendido. Tratadas con FB y 3 hs después con hCG o GnRH.



En los animales tratados con 3 ui de PMSG, el tratamiento con fenobarbital provocó disminución del peso de los ovarios, excepto en aquellos que además recibieron hCG (tabla 3).

El peso del útero de las ratas tratadas con 3 o 6 ui de PMSG aumentó luego de la inyección de fenobarbital. En cambio, la administración de fenobarbital y hCG aumentó el peso uterino sólo en los animales que recibieron 3 ui de PMSG. La administración de GnRH no modificó el peso del útero de los animales tratados con PMSG (tabla 3).

Tabla 3. Efecto del tratamiento con hCG o GnRH a ratas de 27 días. Después de provocarles bloqueo ovulatorio al administrarles 100 mg/Kg del fenobarbital sódico [FB], 48 horas después de haber sido tratadas con 3 o 6 ui de PMSG.

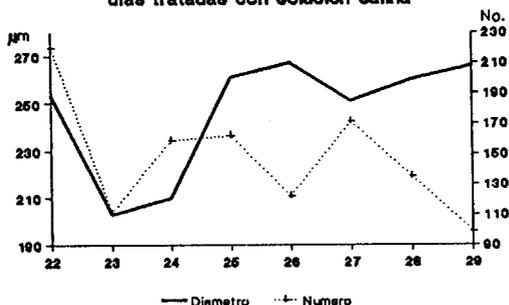
	Número de ovocitos/ animal ovulante	Peso (mg) de Ovarios	de Utero
PMSG 3 ui.	7.1±0.6	34.8±1.1	106.5±2.8
FB	0	27.2±1.3*	145.0±4.2*
hCG 10 ui.	6	39.1±1.5#	123.7±5.3*
GnRH 3.7 µg/Kg	5.8±0.4	27.2±0.8*	105.0±6.3
PMSG 6 ui	25.7±2.3	46.0±1.4	119.9±3.9
FB	0	46.8±2.3	148.8±1.8*
hCG 10 ui.	13.3±3.5*	46.3±2.3	125.8±4.5

* p < 0.001, # p < 0.02 vs pmsg (ANDEVA seguida de la prueba de Duncan).

4. Estudio de las modificaciones de la población folicular inducidos por la administración de PMSG a diversas edades.

En las ratas prepúberes testigo, el número de folículos con diámetro mayor de 70 µm disminuyó en los animales mayores de 22 días de edad, mientras que el diámetro promedio de los folículos aumentó a partir del día 24 y se mantuvo hasta el día 29 (fig. 13).

Fig 13. Promedio del diámetro y número de folículos en ratas prepúberes de 22 a 29 días tratadas con solución salina



Los efectos de la administración de PMSG sobre el diámetro promedio de los folículos dependió de la edad en la que los animales fueron tratados. En los de 21 días se observó aumento del diámetro a partir de las 24 horas del tratamiento, el cual se mantuvo hasta las 72 horas. En los animales de 24 días, se presentó una disminución de este parámetro a las 48 horas y un aumento a las 72 horas. En los de 27 días, no se observaron diferencias significativas a las 24 o 48 horas después de la inyección de PMSG (tabla 4).

Tabla 4. Mediate.e.m. del diámetro promedio de los folículos de ratas de 22 a 29 días tratadas con Vehículo o con 3 ui de PMSG.

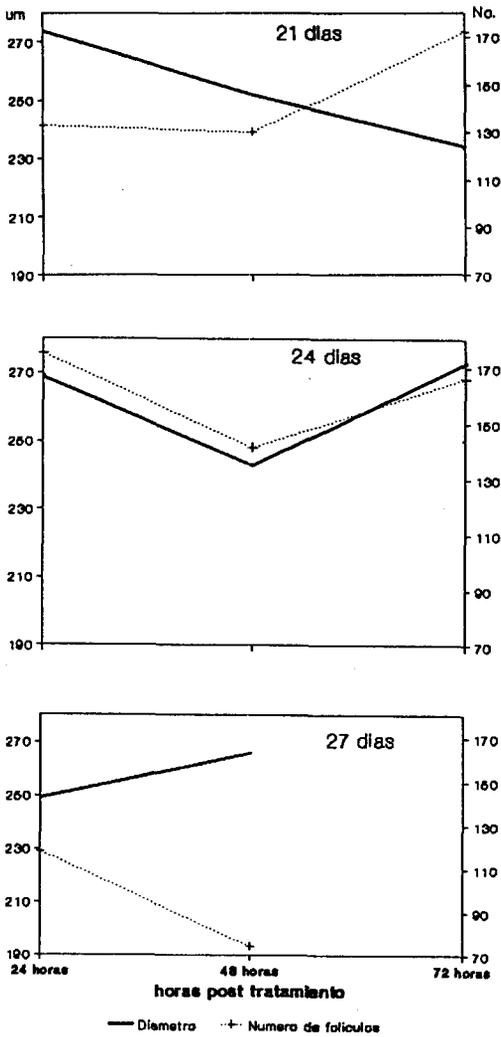
Edad/hora	Vehículo	PMSG
21/24	253 ± 4.1	274 ± 6.2*
21/48	203 ± 5.4	252 ± 6.9*
21/72	210 ± 3.4	234 ± 4.5*
24/24	261 ± 4.7	269 ± 4.9
24/48	267 ± 6.6	243 ± 6.2*
24/72	251 ± 4.9	273 ± 6.5*
27/24	260 ± 5.7	249 ± 6.0
27/48	266 ± 6.7	266 ± 9.4

* $p < 0.05$ vs vehículo (ANDEVA seguida de la prueba de Duncan)

Si en los animales tratados con PMSG se analiza el perfil del diámetro y del número de los folículos medidos, en función del tiempo transcurrido luego de la inyección de la PMSG, se observa que mientras en los animales de 21 días hay una tendencia a la disminución del diámetro folicular promedio y un discreto aumento del número de folículos

medidos 48 horas después del tratamiento, en los animales de 24 días ambos parámetros disminuyeron y en los 27 días aumentó el diámetro promedio y disminuyó el número de folículos contados (fig. 14).

Fig 14. Promedio del diámetro y número de folículos en ratas prepúberes después de 24,48 o 72 h de ser tratadas con PMSG



Cuando la población folicular se analiza en función de su distribución por diámetros, en los ovarios de los animales de 21 días sacrificados a las 72 horas y en los de 24 días a las 48 horas se observa un aumento significativo de los folículos en crecimiento [diámetro 170 a 369 μm]. En este último caso, el aumento se acompañó de la disminución de los folículos pre-ovulatorios [diámetro 370 a 519 μm] (tabla 5).

Tabla 5. Mediate.e.m. del porciento de la población folicular de ratas de 21, 24 y 27 días tratadas con vehículo o PMSG y sacrificadas a las 24, 48 y 72 horas.

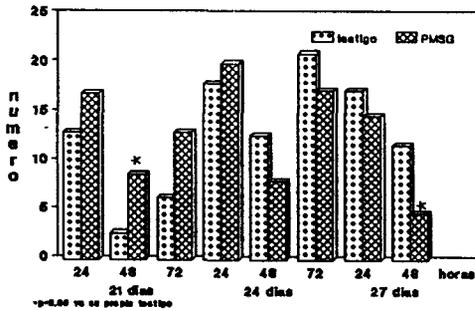
	DIAMETRO FOLICULAR			
	120-169 μm	170-369 μm	370-519 μm	>520 μm
Edad/hora				
21/24 Vh	21.9 \pm 3.7	64.4 \pm 2.6	11.1 \pm 1.0	2.6 \pm 0.4
PMSG	18.3 \pm 5.9	60.6 \pm 3.8	14.9 \pm 1.8	6.2 \pm 2.9
21/48 Vh	41.2 \pm 12.8	49.3 \pm 9.4	6.6 \pm 2.8	2.9 \pm 2.5
PMSG	31.6 \pm 8.9	50.2 \pm 6.7	13.4 \pm 2.3	4.7 \pm 1.9
21/72 Vh	31.2 \pm 2.3	62.9 \pm 1.8	5.2 \pm 2.2	0.7 \pm 0.3
PMSG	21.6 \pm 2.6*	71.7 \pm 2.7*	4.4 \pm 2.3	2.3 \pm 0.8
24/24 Vh	15.6 \pm 3.0	65.5 \pm 2.6	16.9 \pm 5.3	2.0 \pm 0.7
PMSG	17.5 \pm 2.1	63.3 \pm 1.7	15.7 \pm 0.2	3.2 \pm 0.4
24/48 Vh	26.0 \pm 6.9	51.1 \pm 5.4	18.5 \pm 1.5	4.4 \pm 1.6
PMSG	25.6 \pm 3.8	67.6 \pm 2.1*	2.6 \pm 1.3*	4.3 \pm 0.7
24/72 Vh	22.3 \pm 3.3	59.9 \pm 0.8	15.0 \pm 1.9	2.8 \pm 0.8
PMSG	14.9 \pm 2.5	71.3 \pm 5.9	6.5 \pm 3.7	7.3 \pm 3.2
27/24 Vh	16.4 \pm 3.6	62.4 \pm 2.1	17.1 \pm 4.2	4.2 \pm 1.5
PMSG	18.6 \pm 3.8	68.2 \pm 4.3	9.1 \pm 1.5	4.0 \pm 0.6
27/48 Vh	21.1 \pm 5.6	57.8 \pm 4.4	17.5 \pm 2.9	3.6 \pm 1.4
PMSG	20.7 \pm 0.9	61.2 \pm 0.6	11.2 \pm 2.1	6.8 \pm 3.2

* p < 0.05 vs Vh (ANDEVA seguida de la prueba de Duncan)

La distribución porcentual del número de folículos atrésicos en los animales de 24 días tratados con PMSG, disminuyó en los folículos mayores de 350 μm [Vh: 32.1 \pm 4.4 vs PMSG: 14.1 \pm 3.5, $p < 0.05$] a las 48 horas del tratamiento.

Analizados en conjunto, la tasa de folículos normales en las ratas inyectadas con PMSG fue similar a las tratadas con el vehículo [Vh: 1979/3462 vs 1875/3256]. Sin embargo, cuando se analizan los resultados en función de la edad de los animales, se observa que en los de 21 días tratados 48 horas antes con PMSG aumento el número de los folículos atrésicos [con diámetro mayor de 350 μm] y disminuyo en los de 27 días (fig 15).

Fig 15. Numero de folículos atrésicos $>350 \mu\text{m}$ en ratas prepúberes tratadas con Vehículo o PMSG. A las 24, 48 y 72 horas



5. Estudio de los efectos de dos isohormonas de la FSH de rata sobre el desarrollo folicular y la ovulación

5.1. Efectos de las isohormonas con mayor y menor contenido de ácido siálico [tipo ácida y básica]

En los animales de 24 días, la administración de las isohormonas de la rFSH [rFSH-A: básica y rFSH-B: ácida], no indujo apertura vaginal, ni aumento del peso de los ovarios o del útero y los animales no presentaron útero distendido (tabla 6).

Tabla 6. Tasa de animales ovulantes, número de ovocitos por animal ovulante, peso de ovarios y úteros (Mediate.e.m. en mg), porciento de animales con útero distendido (U.D.) y con apertura vaginal (Ap.V), en ratas de 24 días tratadas a las 15:00 h con Vehículo (Vh:0.9% NaCl) o las isohormonas de la FSH (FA o FB: 200 ng/animal) y autopsiados a las 48 horas después del tratamiento.

	OVULANTES	OVOCITOS	OVARIO	U.D.	UTERO	Ap.V.
Vh	0/9	0	23.1±1.3	0	40.0±4.0	0
FA	0/4	0	22.6±1.9	0	48.2±3.6	0
FB	0/4	0	22.2±1.5	0	37.2±3.5	0

5.2. Efecto de las isohormonas de la FSH sobre el crecimiento y diferenciación folicular

En los ovarios de las ratas inyectadas con las isohormonas no se observaron diferencias en el diámetro promedio de los folículos, ni en la distribución de los folículos por diámetro (tabla 7 y 8). No obstante, en los animales tratados con rFSH-A aumentó el número de folículos atrésicos con diámetro >350 μm (fig 16).

Fig 16. Numero de folículos atresicos > 350 µm en ratas de 24 días tratadas con Vehículo, rFSH-A o rFSH-B.

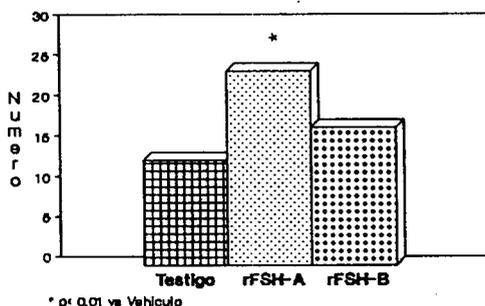


Tabla 7. Mediate.e.m. de la población folicular de ratas de 24 días tratadas con Vehículo, rFSH-A o rFSH-B y sacrificados 48 horas después.

Tratamiento	Diámetro folicular promedio	Promedio del Número de folículos	
		Total	Atrésicos
Vehículo	267 ± 6.6	122.0±39.6	40.0±10.8
rFSH-A	278 ± 6.0	178.7±22.1	55.7±9.6
rFSH-B	269 ± 5.4	176.0±29.6	43.7±9.3

Tabla 8. Mediate.e.m. del porciento de la población folicular en ratas de 24 días tratadas con vehículo, rFSH-A o rFSH-B, 48 horas después.

	Diámetro Folicular			
	120-169 µm	170-369 µm	370-519 µm	> 520 µm
Vh	26.0±6.9	51.1±5.4	18.5±1.5	4.4±1.6
rFSH-A	18.1±2.8	56.9±1.9	16.8±1.2	8.3±2.2
rFSH-B	19.4±3.3	58.4±0.6	15.4±2.3	6.8±1.7

5.3. Capacidad inductora de la ovulación por las isohormonas

En las ratas de 27 días, la administración de rFSH-B no indujo apertura vaginal ni ovulación y los animales no presentaron útero distendido. El peso de los ovarios en los animales tratados con 400 ng de la isohormona, disminuyó significativamente en comparación con el grupo testigo y no se encontraron diferencias en el peso del útero (tabla 9).

Tabla 9. Tasa de animales ovulantes, número de ovocitos por animal ovulante, peso de ovarios y útero (Mediate.e.m en mg), porciento con útero distendido (UD) y apertura vaginal (A.V.), en ratas de 27 días tratadas con vehículo o rFSH-B (200 o 400 ng/animal y autopsiadas a las 72 horas).

	Ovulantes	Ovocitos	Ovarios	UD	Utero	A.V.
Vh	0/13	0	26.7±1.5	0	51.5±4.2	0
200 ng	0/6	0	25.3±0.9	0	50.8±3.3	0
400 ng	0/5	0	21.9±0.6*	0	51.9±9.8	0

*p < 0.001 vs Vh (ANDEVA seguida de la prueba de Duncan)

VI. DISCUSION

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten sugerir que durante el periodo juvenil se producen cambios significativos en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el crecimiento folicular y culminan con la primera ovulación. Asimismo, confirman que en el animal prepúber la respuesta ovulatoria inducida por la administración de PMSG está en función de la dosis y de la edad del animal (39, 68, 73, 93, 94, 95).

En la rata hembra, se ha sugerido que los centros neuroendócrinos que regulan la liberación de la hormona ovulatoria estarían funcionando durante el periodo infantil [animal de 18 días], aunque su puesta en marcha espontánea se produce mucho tiempo después [35-45 días], lo que depende de la cepa, de las condiciones ambientales y del peso corporal de los animales (39, 51, 60). Nuestros resultados indican que al inicio del periodo juvenil, animal de 21 días, la capacidad de la respuesta ovulatoria es muy baja, dado que sólo ovularon dos de los 50 animales tratados con los diferentes regímenes hormonales. La respuesta "trófica" del ovario a las gonadotropinas, medida por el aumento del peso, también es muy baja ya que sólo se observó en los animales tratados con 8 ui de PMSG. Sin embargo, la capacidad secretora de estrógenos, medida por el aumento en el peso del útero, es semejante a la de los animales al final del periodo juvenil y comienzos

del peripuberal. Esta última respuesta, por lo tanto, no estaría vinculada a la masa corporal de los animales sino a otros mecanismos de regulación.

La respuesta de los mecanismos de retroalimentación estimulante a los esteroides que culminan con la ovulación y la respuesta "trófica" del ovario a la PMSG, aumentan durante el transcurso del periodo juvenil. Al parecer, la estabilización del umbral de respuesta de estos mecanismos se alcanza hacia el final de este periodo y el inicio del peripuberal, ya que en la mayoría de los animales tratados a los 24 o 27 días se observó poliovulación y el aumento del peso de los ovarios no estuvo totalmente relacionado con la dosis de PMSG administrada; mientras que en los tratados a los 30 días se observó una relación lineal entre el número de ovocitos liberados, el aumento del peso de los ovarios y la dosis de la hormona.

En el animal prepúber tratado con PMSG, la secreción de estrógenos y andrógenos se inicia a las ocho horas después del tratamiento y las concentraciones plasmáticas máximas se alcanzan a las 48 horas y disminuyen a las 72 horas, cuando aumentan las de progesterona (52). Estos hechos explican parcialmente los resultados del peso del útero en los animales tratados a los 21, 24, 27 y 30 días, ya que a partir de las 48 horas se observó aumento del peso de los úteros y de la incidencia de animales con útero distendido, además este

último parámetro disminuyó significativamente a las 72 horas, lo que se acompañó del aumento de la tasa de animales ovulantes.

El hecho de que el patrón de apertura vaginal y la primera ovulación no coincidan, nos permite sugerir que además de las hormonas esteroideas, en la regulación de ambos eventos participan otros factores, entre ellos la inervación (9, 19, 49, 51, 87).

El análisis de la población folicular indica que, durante la prepubertad, la protección de la PMSG a la atresia folicular se expresa recién a finales de la etapa juvenil [27 días], pero tiene efectos contrarios al inicio de este periodo [21 días]. Esto indicaría que la reactividad del ovario, de los mecanismos de regulación o ambos, son diferentes durante estas etapas de la vida. Si bien el ovario de los animales de 21 días, estimulado con PMSG, secreta estrógenos en cantidades "similares" a la de animales de mayor edad, los efectos estimulantes de los estrógenos sobre la liberación fásica de LH y la consecuente ovulación no se producen. Estos resultados permiten sugerir la existencia de otras vías neuroendócrinas de regulación entre el ovario y el sistema nervioso central. En la rata y el ratón prepúber, la desnervación noradrenérgica periférica permite la acción estimulante de los estrógenos sobre la liberación de LH y la ovulación, a edades a las que el estímulo con PMSG fue

inefectivo (23, 66). Estos hechos nos permiten sugerir que durante el desarrollo puberal normal parte de los efectos de la FSH estarían vinculados con modificaciones de la innervación de los folículos, además de sus posibles efectos de regulación estimulante ["up-regulation"] sobre las acciones de la propia hormona.

La posibilidad de que factores neurales a nivel del propio ovario regulen su respuesta a las gonadotropinas, es apoyada por los resultados obtenidos en el animal de 27 días con bloqueo ovulatorio inducido por la administración de fenobarbital 48 horas después de la PMSG. Al parecer, uno de los efectos del fenobarbital fue el aumento del umbral de respuesta a la hormona ovulatoria ya que sólo 1/6 animales ovuló al ser inyectado con 10 u.i. de hCG, mientras que 5/6 animales lo hicieron en respuesta a la administración de la GnRH. Sin embargo, cuando la dosis estimulante de PMSG fue duplicada [6 ui], la misma dosis de hCG indujo la ovulación en el 66% de los casos [4/6 animales], aunque el número de ovocitos liberados fue significativamente menor. Ello indica que en el animal prepúber, el bloqueo neural modifica el crecimiento y la diferenciación folicular, tal y como ha sido mostrado en otros modelos experimentales (9, 13, 17, 18, 25, 30, 87, 88).

La respuesta de los folículos ováricos a las gonadotropinas también varía con la edad de los animales, hecho que

se puso de manifiesto al considerar el número de folículos medidos y el diámetro promedio de los mismos. En los animales sin tratamiento, tanto el diámetro folicular como el número de folículos medidos mostraron una disminución muy significativa en el día 23 y a partir de ese momento los dos parámetros evolucionaron de manera diferente. Al parecer, una vez que se establece el modelo de crecimiento folicular, medido por el diámetro promedio de los folículos, disminuye el número de folículos que son medidos y la atresia de los mismos. Dado que el tratamiento con PMSG a los animales de 27 días, indujo el mismo tipo de respuesta que la observada en los animales sin tratamiento, podemos presumir que a finales del periodo juvenil normalmente se consolida el modelo de crecimiento folicular que se mantiene en el animal adulto.

Los resultados obtenidos por la inyección de las isohormonas de la FSH de la rata, no nos permiten concluir sobre la posible participación de las mismas en la regulación del crecimiento folicular que culmina con la ovulación. El hecho de que la administración de las isorhomonas con punto isoeléctrico menos ácida haya provocado el aumento del número de folículos atrésicos, podría suponer que estas formas moleculares afectan de manera inhibitoria la actividad de la aromatasas. Otras posibilidades serían que tales efectos se deban a la dosis administrada o al lapso transcurrido entre el tratamiento y la autopsia (sensibilidad o umbral de respuesta hacia la dosis administrada).

VII. CONCLUSIONES

La respuesta ovulatoria inducida 72 horas después de administrar PMSG a ratas de 21, 24, 27 y 30 días de edad dependió de la edad y la dosis.

El número de animales tratados que presentaron útero distendido tuvo relación inversa con el número de animales ovulante.

La apertura vaginal, utilizada como índice de maduración sexual, se observó recién a las 72 horas de la administración de las gonadotrópinas. La respuesta estuvo en función de la edad y la dosis.

El aumento del peso de los ovarios se mostró como una función de la dosis de PMSG inyectada, y se correlacionó con la capacidad ovulatoria.

La actividad esterodogénica del ovario estimulada por las gonadotropinas se expresó a partir de las 48 horas de la inyección, efecto observado por el aumento en el peso del útero.

La administración de PMSG facilitó el crecimiento de los folículos en maduración y disminuyó la proporción de folículos atrésicos con diámetro mayor de 350 μm , efecto que dependió de la edad del animal en estudio.

En los animales tratados con la isohormona que contiene menor residuos de ácido siálico aumentó el número de folículos con signos de atresia.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1.-Advis, J.P.; Ojeda, S.R. (1978). Hyperprolactinemia-induced precocious puberty in the female rat: Ovarian site of action. Endocrinology 103:924-935
- 2.-Arakawa, S.; Iyo, M.; Ohkawa, R.; Kambegawa, A.; Okinaga, S.; Arai, K. (1989). Steroid hormone receptors in the uterus and ovary of immature rats treated with gonadotropins. Endocrinol. Japon 36:219-228.
- 3.-Baker, T.G. (1978). Oogenesis and ovulation. En: Germ cells and fertilization. Reproduction in Mammals. C. R. Austin and R.V. Short (edts). Cambridge University Press, N.Y., Cap. 2:14-45.
- 4.-Bjersing, L. (1978). Maturation, morphology and endocrine function of the follicular wall in mammals. En: The vertebrate ovary. Comparative Biology and Evolution. R.E. Jones (edt) Plenum Press, N.Y., Cap. 6:181-214.
- 5.-Braw, R.H.; Tsafiriri, A. (1980). Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. J. Reprod. Fert 59:267-272.
- 6.-Byskov, A.G. (1978). Follicular atresia. En: The vertebrate ovary. Comparative biology and evolution. R.E. Jones (edt). Plenum Press, N.Y., Cap. 15:533-562.
- 7.-Centola, G. M. (1983). Structural changes: Follicular development and hormonal requirements. En: The Ovary. G. B. Serra (edt). Raven Press, N.Y., p.p. 95-111.
- 8.-Centola, G.M. (1983). Structural changes: Atresia. En: The ovary. G.B. Serra (edt). Raven Press, N.Y. p.p. 113-122.
- 9.- Cruz, M.E.; Chávez, R.; Domínguez, R. (1986). Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. Rev. Invest. Clin. 38:167-171.
- 10.-Channing, C.P.; Anderson, L.D.; Hoover, D.J.; Kolena, J.; Osteen, K.G.; Pomerantz, S.H.; Tanabe, K. (1982). The role of nonsteroidal regulators in control of oocyte and follicular maturation. Rec. Prog. Horm. Res. 38:331-408.
- 11.-Chappel, S.C.; Ulloa-Aguirre, A.; Coutifaris, C. (1983). Biosynthesis and secretion of Follicle Stimulating Hormone Endocr. Rev. 4:179-211.

- 12.-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.
- 13.-Chávez, R.; Cruz, M.E.; Domínguez, R. (1987). Modifications on the ovarian response to gonadotropins induced by catecholamine depletion in vagotomized adult rats. Rev. Invest. Clin. 39:149-153.
- 14.-Dalkin, A.C.; Bourne, G.A.; Pieper, D.R.; Regiani, S.; Marshall, C. (1981). Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. Endocrinology 108:1658-1664.
- 15.-Dekel, N.; Galiani, D.; Beers, W.H. (1988). Induction of maturation in follicle-enclosed oocytes: The response to gonadotropins at different stages of follicular development. Biol.Reprod. 38:517-521.
- 16.-Döhler, K.D.; Wuttke, W. (1974). Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. Endocrinology 94:1003-1007.
- 17.-Domínguez, R.; Cruz, M.E.; Chávez, R. (1989). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: Growth factors and the ovary. A.N.Hirshfield (edt). Plenum Press, N.Y. Cap.39:321-325
- 18.-Domínguez, R.; Cruz, E.; Chávez, R. (1991). Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción. Cap.7 (en prensa).
- 19.-Domínguez, R.; Smith, E.R. (1974). Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. Neuroendocrinology 14: 212-223.
- 20.-Durham, C.R.; Hong, Z.; Masters, B.S.S. (1985). Regulation of aromatase activity of rats granulosa cells: Induction of synthesis of NADPH-cytochrome P450 reductasa by FSH and dibutyryl cyclic AMP. En: Molecular and Cell Endocrinology. E.R. Simpson and C.R. Mendelson (edts). 40;211-219.
- 21.-Edwards, R.G.; Fowler, R.E.; Gore-Langton, R.E.; Gosden, R.G.; Jones, E.C.; Readhead, C.; Steptoe, P.C. (1977). Normal and abnormal follicular growth in mouse, rat and human ovaries. J. Reprod. Fert. 51:237-263.

- 22.-Erickson,G.F. (1982). Follicular maturation and atresia. En: Serono Symposium # 42, "The gonadotropins: Basic Science and Clinical Aspects in Females", C.Flamigni and J.R.Givens (edts) Academic Press, N.Y., p.p. 177-185.
- 23.-Flores, A.; Ayala, M. E.; Domínguez, R. (1990). Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the prepubertal and the adult rat?. Med. Sci. Res. 18:817-818.
- 24.-Greenwald, G. S. (1978). Follicular activity in the mammalian ovary. En:The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution. R.E. Jones (edt.). Plenum Press, N.Y., Cap.19: 639-689.
- 25.-Hagino, N. (1967). Site of positive feedback of ovarian hormones in immature female rats. Japn. J. Physiol 17:190-199
- 26.-Hagino, N.; Goldzieher, J. W. (1970). Effect of timing and quantity of estrogen on gonadotrophin-induced ovulation in immature rats. Endocrinology 86:29-33.
- 27.-Henderson, K. M. (1981). Effect of LH factors regulating ovarian cholesterol metabolism and progesterone synthesis in PMSG-primed immature rats. J.Reprod.Fert. 61:373-380.
- 28.-Hirshfield,A.; DePaolo,L.V. (1981). Effect of supression of the surge of follicle-stimulating hormone with porcine follicular fluid on follicular development in the rat. J. Endocr. 88:67-71
- 29.-Hirshfield,A.N.;Midgley,A.R. (1978).Morphometric analysis of follicular development in the rat. Biol. Reprod.19:597-605
- 30.-Hirshfield, A.N.; Midgley, A.R. (1978). The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. Biol. Reprod. 19:606-611.
- 31.-Hsueh,A.J.; Erickson,G.F.; Papkoff,H. (1983). Effect of diverse mammalian gonadotropins on estrogen and progesterone production by cultures rat granulosa cells. Arch. Biochem. Bioph. 225:505-511.
- 32.-Hsueh,A.J.W.;Jones,P.B.C.;Adashi,E.Y.;Wana,C.;Zhuana,L.-Z.;Welsh,T.H. (1983). Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats. J. Reprod. Fert. 69:325-342.

- 33.-Hubbard, C.J.; Greenwald, G.S. (1981). Changes in DNA, cyclic nucleotides and steroids during induced follicular atresia in the hamster. J. Reprod. Fert. 63:455-461.
- 34.-Hubbard, C.J.; Greenwald, G.S. (1983). In vitro effect of luteinizing hormone on induced atretic graafian follicles in the hamster. Biol.Reprod. 28:849-859.
- 35.-Ireland, J.J. (1987). Control of follicular growth and development. J. Reprod. Fert., Suppl. 34: 39-54.
- 36.-Ireland, J. J.; Richards, J. S. (1978). A previously undescribed role for luteinizing hormone (LH:hCG) on follicular cell differentiation. Endocrinology 102:1458-1465.
- 37.-Jia, X-C; Hsue, A.J.W. (1984). Homologous regulation of hormone receptor: Luteinizing hormone increases its own receptors in cultures rat granulosa cells. Endocrinology 115: 2433-2439.
- 38.-Maxson, W. S.; Haney, A. F.; Schomberg, D. W. (1985). Sterodogenesis in porcine atretic follicles: Loss of aromatase activity in isolated granulosa and theca. Biol. Reprod. 33: 495-501.
- 39.-McCormack, C. E.; Meyer, R. K. (1964). Minimal age for induction of ovulation with progesterone in rats: Evidence for neural control. Endocrinology 74:793-799.
- 40.-Meijs-Roelofs, H.M.; Kramer, P.; Osman, P. (1985). Precocious ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in the immature female rat: Comparison of follicle growth induced by treatment with human chorionic gonadotrophin and by electrical stimulation of the hypothalamus. J. Endocr. 106:61-66.
- 41.-Meijs-Roelofs, H. M.; Kramer, P.; Sander, H.J. (1983). Changes in serum concentration of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty. J.Endocr. 98:241-249.
- 42.-Meijs-Roelofs, H. M.; Uilenbroek, J. Th. J.; deJong, F. H Welshen, R. (1973). Plasma oestradiol-17 β and its relationship to serum follicle-stimulating hormone in immature female rats J. Endocr. 59:295-304.
- 43.-Merchant-Larios, H. (1978). Ovarian differentiation. En: The vertebrate ovary. Comparative Biology and Evolution. R. E. Jones (edt), Plenum Press, N.Y., Cap 2:47-81.
- 44.-Merchant-Larios, H. (1984). Germ and somatic cell interactions during gonadal morphogenesis. En: Ultrastructure of reproduction. J. VanBlerkom and P.M. Motta (edts). Martinus Nijhoff Publishers, Boston. Cap. 3:19-30.

- 45.-Merchat-Larios,H.; Chimal-Monroy,J. (1989). The ontogeny of primordial follicles in the mouse ovary. Developments in Ultrastructure of Reproduction. Alan R. Liss, Inc. p.p. 55-63
- 46.-Merk, F. B.; Botticelli, C. R.;Albright, J. T. (1972). An intercellular response to estrogen by granulosa cells in the rat ovary:An electron microscope study. Endocrinology 90:992-1007.
- 47.-Nicosia, S. V. (1980). In vitro studies of follicular morphogenesis, development and atresia. En: Elsevier/North-Holland Biomedical Press Endocrine Physiopathology of the Ovary.R.I.Tozzini, G.Reeves and R.L.Pineda (edts), p.p. 43-62
- 48.-Oakberg,E.F. (1979). Follicular growth and atresia in the mouse. In Vitro 15:41-49.
- 49.-Ojeda,S.R.;Advis,J.P.;Andrews,W.W. (1980). Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. Fed. Proc 39:2365-2371.
- 50.-Ojeda, S. R.; Aguado, L. I.; Smith (White) S. (1983). Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: The rat as a model. Neuroendocrinology 37:306-313.
- 51.-Ojeda,S.R.;Urbanski,H.F.;Ahmed,C.E. (1986). The onset of female puberty: Studies in the rat. Rec. Prog. Horm. Res. 42: 385-442.
- 52.-Parker,C.R. Jr.; Costoff,A.; Muldoon, T.G.; Mahesh, V.B. (1976). Actions of pregnant mare serum gonadotropin in the immature female rat: Correlative changes in blood steroids, gonadotropins, and cytoplasmic oestradiol receptors of the anterior pituitary and hypothalamus. Endocrinology 98:129-138
- 53.-Peluso, J. J. (1976). Control of ovarian development. En: Perspective in Human Reproduction. E. S. E. Hafez and J. J. Peluso (edts).Ann. Arbor. Science Publishers Inc. Detroit, Michigan. Sexual Maturity: Physiological and Clinical Parameters. Neuroendocrine and Mechanisms. Vol.3.Secc 1:71-84
- 54.-Peters,H.(1969). The development of the mouse ovary from birth to maturity. Acta Endocrinologica 62:98-116.
- 55.-Peters, H. (1978). Folliculogenesis in mammals. En: The vertebrate ovary. Comparative biology and evolution. R. V. Jones (edt). Plenum Press, N.Y., Cap. 4:121-144.

- 56.-Peters, H.; Byskov, A.G.; Himelstein-Braw, R.; Faber, M. (1975). Follicular growth: The basic event in the mouse and human ovary. J. Reprod. Fert. 45:559-566.
- 57.-Quinn, D.L.; Zarrow, M.X. (1964). Inhibition of pregnant-mare's serum-induced ovulation in the immature rat. Endocrinology 74:309-313.
- 58.-Ramaley, J.A. (1979). Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. Biol.Reprod. 20:1-31.
- 59.-Ramaley, J.A. (1980). Biological clocks and puberty onset. Fed. Proc. 39:2355-2359.
- 60.-Ramírez, V. D. (1973). Endocrinology of puberty. En: Handbook of Physiology. American Physiological Society. R. Greep and E. Astwood (edts). Washington, D.C. Secc. 7, Vol.2, Cap. 1:1-28.
- 61.-Ramírez, V.D.; Feder, H.H.; Sawyer, C.H. (1984). The role of brain catecholamines in the regulation of LH secretion: A critical inquiry. Frontiers in Neuroendocrinology. L. Martini and W. R. Ganong (edts), Raven Press, N.Y. Vol 8. Cap.2:27-84
- 62.-Richards, J. S. (1978). Hormonal control of follicular growth and maturation in mammals. En: The vertebrate ovary. Comparative biology and evolution. R.E. Jones (edt). Plenum Press, N.Y., Cap. 9: 331-360.
- 63.-Richards, J. S. (1980). Maturation of ovarian follicles: Actions and interactions of pituitary and sex hormones on follicular cell differentiation. Physiol. Reviews 60: 51-89
- 64.-Richards, J. S.; Bogovich, K. (1982). Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone on follicular development in the immature rat. Endocrinology 111:1429-1438.
- 65.-Richards, J.S.; Ireland, J.J.; Rao, M.C.; Bernath, G.A.; Midgley, A.R.Jr.; Reichert, L.E.Jr. (1976). Ovarian follicular development in the rat: Hormone receptor regulation by estradiol, follicle stimulating hormone and luteinizing hormone. Endocrinology 99: 1562-1570.
- 66.-Rosas, P., Argüello, M.S., Domínguez, R. (1989). Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. Med. Sci. Res. 17:285-286.

67.-Sasamoto, S.; Harada, S.; Taya, K. (1977). Selective release of follicle-stimulating hormone during the period of ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in dioestrous rats. J. Endocr. 75: 179-180.

68.-Sasamoto, S.; Johke, T. (1975). FSH and LH release during the first ovulation period of immature rat pretreated with PMS. Biol. Reprod. 13: 195-202.

69.-Sawamoto, J.; Sasamoto, S. (1973). Follicular development after the first ovulation in immature rats pretreated with PMSG. Endocrinol. Japon 20: 581-585.

70.-Schwartz, N.B. (1974). The role of FSH and LH and of their antibodies on follicle growth and ovulation. Biol. Reprod. 10: 236-272

71.-Schwartz, N.B. (1982). Novel peptides in ovarian follicular fluid: Implications for contraceptive development. En: Research Frontiers in Fertility Regulation. G.I. Zatzuchni and K. Osbernk (edts). Vol 2:1-11.

72.-Smith-White, S.; Ojeda, S. R. (1981). Changes in ovarian LH-RH receptor content during the onset of puberty in female rat. Endocrinology 108:347-349.

73.-Taya, K.; Sawamoto, J.; Sasamoto, S. (1974). The effect of the initial age and body weight on PMS-induced ovulation in immature rats. Japn J. Animal Science 20:1-6.

74.-Tsafriri, A. (1978). Oocyte maturation in mammals. En: The vertebrate ovary. Comparative biology and evolution. R. E. Jones (edt). Plenum Press, N.Y. Cap. 11:409-442.

75.-Tsafriri, A.; Kraicer, P.F. (1972). The time sequence of ovum maturation in the rat. J. Reprod. Fert. 29: 387-393.

76.-Tsonis, C. G.; Sharpe, R. M. (1986). Dual gonadal control of follicle-stimulating hormone. Nature 321: 724-725.

77.-Uilenbroek, J.T.J.; Arendsen de Wolff-Exalato, E.; Welshen, R. (1976). Studies on the significance of high levels of follicle stimulating hormone for follicular development in immature rats. Ann. Biol. Anim. Biochem. Biophys. 16:297-305.

78.-Uilenbroek, J.Th.J.; vander Linden, R. (1983). Changes in gonadotrophin binding to rat ovaries during sexual maturation. Acta Endocrinologica 103:413-419.

- 79.-Ulloa, A-Aguirre; Chappel, S.C. (1982). Multiple species of follicle-stimulating hormone exist within the anterior pituitary glands of male golden hamsters. J. Endocrinol. 95: 257-266.
- 80.-Ulloa-Aguirre, A.; Damián-Matsumara, P.; Espinoza, R.; Domínguez, R.; Morales, L; Flores, A. (1990). Effects of neonatal androgenization on the chromatofocusing pattern of anterior pituitary FSH in the female rat. J. Endocr. 126:323-332.
- 81.-Ulloa-Aguirre, A.; Espinoza, R.; Damian-Matsumura, P.; Chappel, S. C. (1988). Immunological and biological potencies of the different molecular species of gonadotrophins. Human Reprod. 3:491-501.
- 82.-Ulloa-Aguirre, A.; Espinoza, R.; Damian-Matsumura, P.; Larrea, F.; Flores A.; Morales, L; Domínguez, R. (1988). Studies on the microheterogeneity of anterior pituitary follicle-stimulating hormone in the female rat. Isoelectric focusing pattern throughout the estrous cycle. Biol. Reprod. 38:70-78.
- 83.-Ulloa-Aguirre, A.; Mejía, 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. Endocr. 110:539-549.
- 84.-Ulloa-Aguirre, A.; Torra, E.; Dominguez, R.; Scherpbier, R.; Larrea, F. (1985). Effects of oestradiol-17 β and LRH upon the two fractions of pituitary follicle-stimulating hormone separated by concanavalin-A chromatography. Acta Endocrinológica 110: 475-482.
- 85.-Urbanski, H. F.; Ojeda, S. R. (1986). The development of afternoon minisurges of luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats is ovary dependent. Endocrinology 118 :1187-1193.
- 86.-Villavicencio, J. (1989). Regulación del crecimiento folicular en la rata prepúber. I: Efectos de la administración de PMSG a los 21, 24 y 27 días de edad. En: XXXII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. Oaxtepec, Mor., p. C-50.
- 87.-Villavicencio, J.; Domínguez, R. (1988). Different ovulatory response to copulatory stimulus in rats treated with reserpine or atropine on diestrus day one. Rev. Invest. Clín. 40:231-235.

- 88.-Wagner, J.W.; Brown-Grant, K. (1965). Studies on the time of luteinizing hormone release in gonadotrophin-treated immature rats. Endocrinology 76:958-965.
- 89.-Welschen, R.; Dullaart, J. (1974). Serum concentrations of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after unilateral ovariectomy in the adult rat. J. Endocr 63:421-422
- 90.-Welschen, R.; Dullaart, J. (1976). Administration of anti-serum against ovine follicle-stimulating hormone or ovine luteinizing hormone at pro-oestrus in the rat.: Effects on follicular development during the oncoming cycle. J. Endocr. 70:301-306.
- 91.-Wilson, C.A.; Leigh, A.J.; Chapman, A.J. (1990). Gonadotrophin glycosylation and function. J. Endocr. 125: 3-14.
- 92.-Zarrow, M. X.; Brody, P. N.; Clark, J. H. (1971). Plasma progesterone levels in the pregnant mare's serum (PMS)-treated immature rat. Fert. Ster. 22:790-793.
- 93.-Zarrow, M.X.; Gallo, R.V. (1969). Action of progesterone on PMS-induced ovulation in the immature rat. Endocrinology 84: 1274-1276.
- 94.-Zarrow, M.X.; Quinn, D.L. (1963). Superovulation in the immature rat following treatment with PMS alone and inhibition of PMS-induced ovulation, J. Endocr. 26: 181-188
- 95.-Zarrow, M.X.; Wilson, E.D. (1961). The influence of age on superovulation in the immature rat and mouse. Endocrinology 69: 851-855.
- 96.-Zelevnik, A.J.; Midgley, A.R.Jr.; Reichert, L.E.Jr. (1974). Granulosa cell maturation in the rat: Increased binding of human chorionic gonadotrophin following treatment with follicle-stimulating hormone in vivo. Endocrinology 95: 818-825.
- 97.-Zlotkin, T.; Farkash, Y.; Orly, J. (1986). Cell specific expression of immunoreactive cholesterol side-chain cleavage cytochrome P450 during follicular development in the rat ovary. Endocrinology 119:2809-2820.