



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas

Coordinación de Posgrado

**SUPLEMENTACIÓN DE GLUTAMATO, INICIO DE
PUBERTAD Y NIVELES SÉRICOS DE
TRIYODOTIRONINA EN CABRAS**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

**EN RECURSOS NATURALES Y MEDIO AMBIENTE
EN ZONAS ÁRIDAS**

PRESENTA:

JOSÉ IGNACIO LÓPEZ MEDRANO

Bermejillo, Durango, México. Abril 2009.



Tesis realizada por José Ignacio López Medrano bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito para obtener el grado de:

**Maestro en Ciencias en Recursos Naturales y
Medio Ambiente en Zonas Áridas**

DIRECTOR



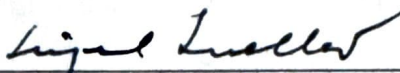
Ph.D. César Alberto Meza Herrera

ASESOR



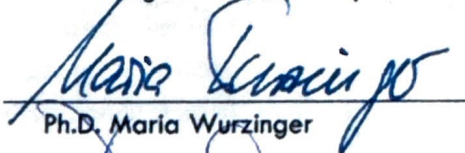
Ph.D. Antonio González-Bulnes

ASESOR



Ph.D. Miguel Mellado Bosque

ASESOR



Ph.D. María Wurzinger

ASESOR



Ph.D. Ricardo Trejo Calzada

Bermejillo, Durango, México. Abril, 2009.

Agradecimientos

A Dios que ha puesto los medios para realizar una Maestría; por darme fortaleza física y espiritual para seguir siempre adelante.

A la URUZA-UACH, una institución que me ha dado todo y que me ha permitido formarme profesionalmente desde la licenciatura y ahora en la maestría, por que mi vida ha sido una antes y otra totalmente diferente y llena de satisfacciones después de la universidad.

Agradezco al Ph.D. Cesar A. Meza Herrera, que me permitió estar en este proyecto de tesis y por depositar su confianza en mí, quien además de ser el director de esta tesis, sin duda es una de las personas que mas ha contribuido a mi formación profesional. Admiro su calidad humana.

A la Dra. Maria Wurzinger un agradecimiento especial por su gran apoyo y colaboración en la preparación y traducción al idioma ingles de la ponencia presentada en el Internacional Goat Association, así como sus críticas y comentarios que enriquecieron y mejoraron la presentación.

Mi mas profundo agradecimiento **a cada uno de los miembros de mi comité asesor**, Ph.D. Antonio González-Bulnes (INIA, España), Ph.D. Miguel Mellado Bosque (UAAAN, Saltillo, México), Ph.D. Maria Wurzinger (BOKU Austria), Ph.D. Ricardo Trejo Calzada (URUZA-UACH, Bermejillo Durango, México) quienes me ayudaron con su asesoría, consejos y amistad a culminar de la mejor manera este trabajo.

Dedicatoria

A mis Padres: primero que nada a mi mamá por su gran amor y apoyo, por ser mi fortaleza e impulso en los momentos más difíciles; a mi papá por sus consejos y el gran ánimo que siempre encontré en sus palabras.

Para mi futura esposa, el amor de mi vida y la mujer en la que encontré la gran felicidad que siempre soñé; por que con su gran alegría y amor, me dio la suficiente fuerza y motivación para superarme día con día.

Por haberme aceptado para compartir la vida junto a ella.

Te amo yuri...

Para mis hermanos, Vero, Rosy, Gloria, Dani, Martha, Anahi, Jesús y mis dos sobrinos Paola e Iván, que siempre me han dado su cariño.

Para Salomón Prone y Rosa Maria Nevarez, en los que siempre encontré un gran apoyo, confianza y ayuda en todo momento, además de ser excelentes personas.

Para toda mi familia, Medrano Perea y López Jurado, por que todos han sido parte de este éxito y siempre he encontrado en ellos una gran motivación.

Para mis amigos Luis Carlos, Miguel Ángel, Oscar, José, Jairo, Miriam, Toño, Héctor, por su compañía, amistad incondicional y por los buenos momentos de convivencia.

Agradezco también:

Al consejo nacional de ciencia y tecnología (CONACYT) por el apoyo y patrocinio que me brindó durante dos años para la realización de la maestría y de este proyecto de tesis.

Así también al apoyo recibido a través de los siguientes proyectos:

Proyecto internacional con financiamiento de la Unión Europea, ALFA-III-ALAS “REFORM AND DEVELOPMENT OF MASTERS PROGRAMS IN FOUR LATINAMERICAN COUNTRIES”, integrada por un consorcio de 7 Universidades Latinoamericanas y 3 Universidades Europeas, con registro DCI-ALA/10.09.01/08/19189/161-358/ALFA-III-82.

“RED INTERNACIONAL DE FORTALECIMIENTO ACADEMICO E INVESTIGACION DEL POSGRADO UACH-URUZA”, integrado por instituciones Científicas de Austria, España, Italia y México, financiado por el CONACYT-FOMIX-DURANGO, con registro CONACYT-DGO-2008-C01-87559.

CONTENIDO

ÍNDICE DE FIGURAS	viii
ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE TABLAS	ix
CUADRO DE ABREVIATURAS	x
RESUMEN	xii
ABSTRACT	xii
 I. INTRODUCCION	 13
II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	17
2.1 Hipótesis.....	17
2.2 Objetivos.....	17
 III. REVISIÓN DE LITERATURA	 18
3.1 Las cabras como un sistema de subsistencia	18
3.2 Los factores ambientales y la respuesta fisiológica animal.....	19
3.3 Influencia de los factores ambientales sobre la producción animal	22
3.4 La Pubertad	25
3.4.1 ¿Cuándo madura el sistema neuronal GnRH?	26
3.4.1.1 Periodos embrional y fetal.....	26
3.4.1.2 Maduración postnatal.....	28
3.4.2 ¿Que determina el tiempo de la pubertad?	29
3.4.3 La secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es esencial para la pubertad.....	31
3.4.4 Desarrollo del sistema secretor de GnRH.....	32
3.4.5 La pubertad es una reactivación de la secreción de GnRH.....	33
3.5 El gen Kiss-1.....	36
3.5.1 El receptor GPR54	38
3.5.2 Las Kisspeptinas y el GPR54 como señalizadores de la pubertad	39
3.5.3 Los Neuronas de Kisspeptinas como reguladores centrales	41
3.6 El sistema aminoácidos excitadores: Descripción y localización en tejidos neuroendocrinos.....	46
3.6.1 AAEs endógenos y su localización en el hipotálamo	47
3.6.1.1 AAEs endógenos.....	47
3.6.1.2 Localización de los AAEs en el hipotálamo.....	49
3.6.1.3 Tipos de receptores de AAE.....	50
3.6.1.4 Transportadores de EAA.....	52
3.7 Neurobiología de la Pubertad	52
3.7.1 Neurotransmisores y su papel en la secreción de GnRH al inicio de la pubertad	53
3.7.2 Neurotransmisores inhibidores.....	53
3.7.2.1 Amino ácido inhibitorio GABA.....	54
3.7.2.2 El papel de GABA en la liberación de GnRH.....	55
3.7.3 Neurotransmisores estimuladores.....	57
3.7.3.1 Desarrollo de cambios en la síntesis y liberación de glutamato	57
3.7.3.2 Papel del glutamato en la pubertad.....	59
3.8 La glándula tiroides y biosíntesis de hormonas.....	60
3.8.1 La hormona estimulante de la tiroides (TSH, tirotrópina).....	62

3.8.2	Las Hormonas de la tiroides	63
3.8.3	El metabolismo de las hormonas de la tiroides	66
3.8.4	Hormonas de la tiroides a nivel génico	68
3.8.5	Regulación de la reproducción por hormonas de la tiroides (THs)	70
3.8.5.1	THs y la estacionalidad reproductiva	70
3.8.5.2	Hormonas de la tiroides en tejidos reproductivos	71
IV.	MATERIALES Y MÉTODOS	74
4.1	Localización del área experimental	74
4.2	Animales, su alimentación y duración del periodo experimental	74
4.3	Diseño experimental y de tratamientos	74
4.4	Preparación de la solución buffer	75
4.5	Registro de peso vivo (PV) y condición corporal (CC)	77
4.6	Muestreo intermitente de sangre, colección y almacén de muestras	76
4.7	Cuantificación de triyodotironina (T ₃) y progesterona (P ₄) en suero y criterios para evaluar la actividad reproductiva	77
4.8	Análisis estadísticos	77
4.8.1	Análisis de ji-cuadrada	78
4.9	Modelos estadísticos	78
V.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	80
5.1	Resultados	80
5.1.1	Peso vivo y condición corporal	80
5.1.2	Concentraciones séricas de T ₃ y porcentaje de pubertad	80
5.1.3	Inducción de la pubertad	81
5.2	Discusión	82
VI.	CONCLUSIONES	88
VII.	LITERATURA CITADA	89

ÍNDICE DE FIGURAS

No.	Título	Página
1	El proceso de retroalimentación negativa, ilustrando el mantenimiento del equilibrio corporal (homeostasis) en un animal sujeto a cambio ambiental.	20
2	Ontogenia del sistema GnRH-Pituitario-Gonadal antes del nacimiento y hasta después del inicio de la pubertad en mono Rhesus y hembras humanas.	28
3	Representación esquemática de los cambios postnatales en la liberación de GnRH y eventos de neurotransmisión que ocurren en el hipotálamo en asociación con la pubertad en primates hembras no humanos.	30
4	El tiempo de la pubertad en función del control de la secreción de GnRH, reflejando la integración de múltiples señales internas y externas sobre un proceso determinado genéticamente.	32
5	Características estructurales de kisspeptinas de humanos, generadas mediante corte forma un precursor común, la pre-pro-kisspeptina.	40
6	Representación esquemática del papel de kisspeptina (KP) en el eje hipotalámico pituitario gonadal.	41
7	Las kisspeptinas estimulan el eje neuroendocrino reproductivo, y los esteroides sexuales diferencialmente regulan la expresión de mRNA de <i>Kiss-1</i> en diferentes núcleos en el cerebro anterior.	42
8	Los neurones de kisspeptinas pueden actuar como procesadores centrales para las señales transmitidas de la periferia a los neurones de GnRH.	43
9	Modelo teórico para el papel de los neurones de Kiss-1 como integradores clave en la red central controlando la secreción de GnRH y por lo tanto el eje gonadotrópico.	45
10	Resumen del sistema EAA. El neurotransmisor glutamato es almacenado en las terminales sinápticas en el neurón presináptico.	46
11	Comprensión actual del mecanismo del inicio de la pubertad en primates no humanos.	59

12	Representación esquemática de la ruta biosintética de hormonas de la tiroides triyodotironina (T ₃) y tiroxina (T ₄) en las células foliculares tiroideas.	62
13	Estructura de las hormonas de la Tiroides.	65
14	Estructuras e interacciones entre las principales yodotironinas.	66
15	Activación de genes en respuesta a hormonas de la tiroides (THRG) a través de la unión de T ₃ a su receptor (TR) y la unión al elemento de respuesta tiroideo (TRE) localizado en la región promotora de THRG.	69

ÍNDICE DE CUADROS

No.	Título	Página
1	Medias de mínimos cuadrados para el peso vivo (PV, kg), y condición corporal (CC, unidades) al final del experimento en cabras prepúberes bajo condiciones naturales de luz en ambiente de zonas áridas.	80
2	Medias de mínimos cuadrados para las concentraciones de T ₃ y el porcentaje de pubertad en cabras prepúberes bajo condiciones naturales de luz en ambiente de zonas áridas.	81
3	Análisis de χ^2 para el número de cabras que entraron a pubertad a una edad más temprana.	82

ÍNDICE DE TABLAS

No.	Título	Página
1	Propiedades y características de receptores a glutamato ionotrópicos y metabotrópicos.	52
2	Criterios de clasificación para condición corporal	76

CUADRO DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AAE	Aminoácidos excitadores
AMPA	Acido Alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionico
ANOVA	Análisis de varianza
Arc	Núcleo arqueado
ATP	Trifosfato de adenosina
AVPV	Núcleo periventricular anteroventral
Ca⁺²	Calcio
CC	Condición corporal
CONT	Tratamiento control
cAMP	Monofosfato de adenosina cíclico
CV	Coeficiente de variación
DNA	Ácido desoxiribonucleico
E₂	Estradiol
ENm	Energía neta metabolizable
FF	Fluido folicular
FSH	Hormona folículo estimulante
GABA	Ácido Gamma amino butírico
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GnRH-R	Receptor de Hormona Liberadora de Gonadotropinas
GPR54	Receptor acoplado a Proteína G
GS	Glutamina sintetasa
HCL	Acido clorhídrico
HH	Hipogonadismo hipogonadotrópico
I⁻	Yodo
IP₃	Inositol trifosfato
kg	Kilogramos
LH	Hormona luteinizante
LN	Latitud norte
LO	Longitud oeste
mM	Micro Mol
ME	Eminencia media
MIT	Monoyodo-tirosinas
DIT	Diyodo-tirosinas
mGluR	Receptor metabotropico de AAE
mL	Mililitro
Mkal	Mega Calorías
MPOA	Área preóptica medial
mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
msnm	Metros sobre el nivel del mar
NIS	Simportador Na ⁺ /I ⁻
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartato
ng	Nanogramo
nmol	Nano mol
NO	Oxido nítrico
NOS	Oxido nítrico sintetasa
OVLt	Órgano vascular de la lamina terminal

OVX	Ovariectomizadas
PAG	Glutaminasa fosfato-activada
pH	Potencial de Hidrógeno
PLC	Fosfolipasa C
PC	Proteína cruda
PV	Peso vivo
POA	Área preóptica
P4	Progesterona
RIA	Radioinmunoanálisis
SAS	Sistema de análisis estadístico
SCN	Núcleo supraquiasmático
SNC	Sistema nervioso central
SON	Núcleo supraóptico
T₂	Diyodotironina
T₃	Triyodotironina
T₄	Tiroxina
Tg	Tiroglobulina
TBG	Globulina enlazadora de tiroxina
TH	Hormonas de la tiroides
TR	Receptor de hormonas de la tiroides
TREs	Elementos de respuesta a hormonas de la tiroides
TSH	Hormona estimulante de la tiroides (tirotropina)
TSHR	Receptor de hormona estimulante de la tiroides
TPO	Peroxidasa tiroidea
UTM	Universal transversa de mercator
VMN	Núcleo ventromedial

DATOS BIOGRAFICOS

El autor de la presente investigación Ing. José Ignacio López Medrano realizó sus estudios en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA) perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), durante el periodo 2001-2006, obteniendo el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas Pecuarios de Zonas Áridas, con la tesis titulada: aminoácidos neuroexcitadores, función ovárica y patrón de secreción de LH, en cabras bajo fotoperiodos crecientes.

Durante el periodo Enero 2007- Diciembre 2008, realizó sus estudios de maestría en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas (URUZA), perteneciente a la Universidad Autónoma Chapingo (UACH); de igual manera durante este periodo participó como Asistente de Investigador de los proyectos: 1.- Aminoácidos excitadores, fotoperiodos crecientes y actividad ovárica en cabras: Inicio de pubertad y niveles séricos de insulina y triyodotironina. Cuantificación de progesterona como marcador endocrino de pubertad. Financiamiento: UACH-DGIP-REBIZA-URUZA: \$80,000.00 (REBIZA No. 08-300-502 & 08-300-503).

2.- Efecto de la suplementación de *Atriplex nummularia*, aminoácidos excitadores y betacaroteno sobre tasa ovulatoria, fertilidad y tasa de implantación embrionaria en cabras sujetas a un empadre no convencional en la Comarca Lagunera. Financiamiento: CONACyT-SIVILLA, No. 2002-0401009, \$480,000.00, URUZA-UACH-UAAAAN-UL,FMVYZ-UAZ..

En el 2008 participó como speaker en el 9th Internacional Conference on Gotas-International Goat Association.

Ha publicado dos artículos indexados por el CONACyT: 1. Effect of exogenous glutamate supply on the onset of puberty in goats. II. Serums levels of triiodothyronine. In press. 2009, Journal of Tropical and Subtropical Agroecosystems.

2. Effect of exogenous glutamate supply on the onset of puberty in goats. I. Serums levels of insulin. In press. 2009, Journal of Tropical and Subtropical Agroecosystems.

El Ing. José Ignacio López ha asesorado 5 tesis de licenciatura en la URUZA-UACH.

Actualmente labora como asesor técnico en el Despacho "Especialistas en Agronegocios S.C.", Bermejillo, Dgo., donde a través de la asesoría técnica y financiera, lleva a cabo la elaboración de proyectos para el sector ganadero, así como la promoción y expansión de los esquemas financieros disponibles en la banca, coordinado a través de FIRA.

SUPLEMENTACIÓN DE GLUTAMATO, INICIO DE PUBERTAD Y NIVELES SÉRICOS DE TRIYODOTIRONINA EN CABRAS

SUPPLEMENTATION OF GLUTAMATE, ONSET OF PUBERTY AND SERUMS TRIIODOTHYRONINE LEVES IN GOATS

¹José Ignacio López Medrano y ²Cesar Alberto Meza Herrera

RESUMEN

Mientras las hormonas de la tiroides y sus receptores ováricos son reguladores activos de la función reproductiva, glutamato, el principal aminoácido excitador del sistema nervioso central, tiene un marcado efecto estimulador sobre el eje reproductivo en mamíferos. El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto de la administración de glutamato sobre el inicio de la pubertad en cabras, y la asociación con los niveles séricos de triyodotironina (T₃). El estudio fue llevado a cabo en el norte de México, en la URUZA-UACH (26° LN, 103° LO, 1,117 m) de julio a octubre, con Cabras (n=18) de tres meses de edad 7/8 Saanen-1/8 Criollo. De principios de julio a finales de octubre se colectaron muestras sanguíneas de todas las cabras una vez por semana, para evaluar su contenido de progesterona (P₄) y triyodotironina (T₃) mediante RIA. Los pesos corporales (PV) y la condición corporal (CC) no difirieron (P>0.05) entre tratamientos al inicio (16.65±1.04 kg, y 3.31±0.12) y final (23.2±0.72 kg y 3.53±0.10) del periodo experimental. Sin embargo, la pubertad de las cabras suplementadas con glutamato se presentó más temprano (6.9±0.8 vs. 7.5±1.0 meses de edad; P<0.05) que el grupo control, y presentaron una mayor (P<0.05) respuesta en la actividad ovarica (70% vs 25%). En el mismo sentido, las cabras suplementadas con glutamato mostraron mayores niveles séricos de T₃ (1.55 vs. 1.39±0.04 ng mL⁻¹; P<0.05), con respecto al grupo control. Estos datos soportan la hipótesis de que las cabras puberales son capaces de traducir infusiones de glutamato exógeno en señales endocrinas y metabólicas que inciden sobre la maduración sexual, y que T₃ puede ser considerada un modulador metabólico del proceso que activa el proceso de pubertad en cabras.

Palabras clave: Cabras, Glutamato, Pubertad, Triyodotironina, Progesterona

¹Tesista

²Director

ABSTRACT

While thyroid hormones and their receptors in the ovaries are active regulators of reproductive function, glutamate, the main excitatory amino acid of the central nervous system, has a marked stimulatory effect on the reproductive axis in mammals. The aim of the present study was to evaluate the effect of administration of glutamate on the onset of puberty in goats, and the association with serum triiodothyronine levels (T₃). This study was carried out in northern Mexico at the Southern Goat Research Unit, URUZA-UACH (26° NL, 103° WL, 1,117 m) from July to October, with Three-month-old 7/8 Saanen-1/8 Criollo goats (n=18). Blood samples were obtained from all goats once a week from early July to late October, to asses progesterone (P₄) and triiodothyronine (T₃) by RIA. Live weights (LW) and body condition score (BCS) were similar between groups of goats either at the beginning (16.65±1.04 kg, and 3.31±0.12) or end (23.2±0.72 kg and 3.53±0.10) of the experimental period. Nonetheless, glutamate-supplemented-goats showed earlier (P<0.05) onset of puberty (6.9±0.8 vs. 7.5±1.0 months of age) than control goats, and presented a greater (P<0.05) ovarian activity (70% vs 25%). In addition, the glutamate-supplemented goats depicted higher T₃ serum levels (P<0.05; 1.55 vs. 1.39±0.04 ng mL⁻¹), as compared with the control group. These data support the hypothesis that goats are able to transduce exogenous glutamate infusions into cues for sexual maturation of juvenile animals, and that T₃ could be considered a metabolic modulator of the puberty process in goats.

Key words: Goats, Glutamate, Puberty, Triiodothyronine, Progesterone

I. INTRODUCCIÓN

La influencia del entorno físico en el animal recientemente ha recibido atención; varios términos como ambiente climático, ambiente físico, manejo del ambiente, ambiente social y estrés ambiental son usados para describir las influencias ambientales. El ambiente animal puede variar y ha cambiado con el tiempo y es definido como cualquier factor externo que influencia la respuesta productiva de los animales de granja. Esto incluye, temperatura ambiental efectiva, fotoperiodo, sonido, altitud, contaminantes ambientales y manejo del sistema (Ames, 1983). La reproducción es un proceso complejo cuya instalación y desarrollo implica una estrecha y precisa sincronía con el medio ambiente, abarcando desde la disponibilidad y calidad del alimentos hasta fenómenos geofísicos tales como el fotoperiodo y los factores físicos y sociales (Bronson, 1985).

La estacionalidad reproductiva representa una adaptación natural que da ventajas importantes para la sobrevivencia y desarrollo de las crías, sobre todo cuando los partos coinciden con un buen clima y una buena disponibilidad de forraje. Sin embargo, el periodo de fecundación estacional es también un obstáculo importante para un manejo más sencillo de los ovinos y caprinos (Haresing, 1992), cuando se considera el mercado y los requerimientos económicos (Lindsay y Thimonier, 1988). Por ello, es muy importante desarrollar técnicas que induzcan a las hembras a concebir en los momentos precisos del año, frecuentemente fuera de la estación de actividad sexual (Lindsay y Thimonier, 1988).

El establecimiento de la actividad reproductiva durante la pubertad y la estacionalidad reproductiva, son los aspectos centrales de la reproducción caprina que deben estudiarse de una manera sistematizada ya que, el conocimiento de los factores que determinan su presentación, permitirá desarrollar estrategias para optimizar la producción de esta especie. Los estudios encaminados a determinar y comprender el comportamiento reproductivo de los caprinos, hasta la fecha, no han

logrado integrar de manera precisa la participación de los factores ambientales y la fisiología neuroendocrina particular de la cabra, durante el establecimiento de la actividad reproductiva (Gamboa, 1986).

El inicio de la pubertad en los mamíferos requiere un incremento en la liberación pulsátil de GnRH del hipotálamo, este incremento ocurre debido a cambios coordinados en la comunicación transsináptica y glial-neuronal. El sistema neuronal excitatorio más involucrado en este proceso considera la acción tanto del glutamato como del péptido kisspeptina, para desencadenar señales de neurotransmisión/neuromodulación. Asimismo, las entradas inhibitorias más importantes son proveídas por el ácido-gamma-amino butírico (GABA), mediante la activación de neurones gabaérgicos y opiotérgicos (Ojeda, 2006). Sin embargo el mecanismo que controla el incremento puberal en la liberación de GnRH todavía no es claro.

En primates, el sistema neurosecretor de GnRH se activa durante el periodo neonatal pero posteriormente entra en un estado de dormancia en el periodo juvenil/prepuberal. Estudios recientes sugieren que durante el periodo prepuberal un sistema inhibitorio neuronal suprime la liberación de GnRH y que durante la maduración posterior del hipotálamo esta inhibición prepuberal es removida, permitiendo el establecimiento de un patrón adulto de liberación pulsátil de GnRH (Terasawa y Fernández, 2001).

El glutamato y sus receptores están involucrados en la maduración y mantenimiento de los mecanismos neurales que gobiernan el pico preovulatorio de LH en roedores jóvenes en edad reproductiva y primates no humanos (Genevieve *et al.*, 2005). La maduración de la red neuronal de GnRH durante la transición puberal y el control hipotalámico del ciclo estral se cree que involucra cambios en el balance entre la entrada excitatoria glutamatérgica y la entrada inhibitoria de procesos neuronales GABAérgicos (Claypool *et al.*, 2000). En ratas hembras maduras esteroide-

deprimidas, incrementos en la liberación hipotalámica de glutamato y la activación de su receptor estimulan las neuronas de GnRH e inducen la síntesis y liberación del péptido GnRH y consecuentemente la síntesis y liberación de LH de la pituitaria. El pico preovulatorio de LH es precedido por un incremento en los niveles extracelulares de glutamato en el área preóptica media hipotalámica (Jennes, 2002).

Los aminoácidos excitadores a través de la neurotransmisión regulan la secreción de las hormonas de la tiroides (Arufe *et al.*, 2002) tiroxina y triyodotironina (T_4 y T_3), las cuales son reguladores clave del metabolismo y es conocido que tienen efectos pleiotrópicos en diferentes órganos (Boelaert y Franklin, 2005). Las hormonas de la tiroides provocan una extraordinaria multiplicidad de respuestas bioquímicas, celulares y fisiológicas tanto en organismos simples como complejos. Las diversas acciones de la hormona tiroidea biológicamente activa, L-triyodotironina (T_3), pueden ser divididos en dos grupos: crecimiento-desarrollo y regulación del metabolismo (Tata, 2007). Aunque las hormonas tiroideas están relacionadas en múltiples aspectos de la reproducción, su papel en aspectos reproductivos como la pubertad no ha sido ampliamente estudiado.

El entendimiento de los mecanismos que regulan la función reproductiva tiene importantes implicaciones para diversos campos del desarrollo de la biología, la neurociencia y la psicobiología, además de impactar la ecología del comportamiento y la evolución de las especies (Greives *et al.*, 2008). Muchas de las especies animales experimentan marcadas variaciones en las condiciones ambientales a través del año (Bronson 1989).

En diferentes áreas con clima árido mediterráneo, ovejas hembras jóvenes son cruzadas por primera vez a la edad de 18 meses. Esta práctica es proyectada para permitir a las ovejas lograr una suficiente tasa de crecimiento y peso corporal antes de su primer cruzamiento casi siempre durante la primavera cuando el fotoperiodo no es favorable. Esto es independiente del genotipo de la oveja (Ben Salem *et al.*,

2008). Sin embargo, la mayoría de las ovejas primerizas alcanzan la pubertad de 10-12 meses de edad (Watson and Gamble, 1961) y una buena fertilidad se obtiene cuando el cruzamiento se hace en la etapa de la pubertad (Rekik *et al.*, 2002; Kassem *et al.*, 1989).

Entre el destete y el primer cruzamiento, las ovejas primerizas de regiones áridas y semi áridas resisten temperaturas altas excesivas durante el verano y la falta de pastos naturales, lo que limitan su tasa de crecimiento. Estos animales en crecimiento subsecuentemente pierden peso previo al cruzamiento, por lo tanto afectando su habilidad para reproducirse a una tasa aceptable (Martin *et al.*, 1999).

La reducción de la capacidad reproductiva en respuesta a la falta de alimentación y las pérdidas en peso vivo pueden ser asociadas con una disminución en los impulsos metabólicos a el eje hipotalámico pituitario gonadal (Barb and Kraeling, 2004).

Con el fin de maximizar el éxito reproductivo y evitar la cría durante condiciones de escaso alimento, los animales deben integrar las señales nerviosas que transmiten tanto el estado interno y externo, y alterar apropiadamente la actividad del eje hipotálamo-pituitaria-gonadal (HPG). La ruta neuroendocrina común final donde estos estímulos son integrados para influenciar la función reproductiva es la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) del sistema neural (Greives *et al.*, 2006). El sistema GnRH tradicionalmente ha sido considerado el pináculo del control jerárquico de la regulación descendente de la pituitaria y la función gonadal.

El mecanismo superior responsable para la interpretación del estado interno o externo y la transmisión de esta información al sistema GnRH, sin embargo, no se ha dilucidado del todo. Examinar los cambios en los niveles de hormonas metabólicas y reproductivas en respuesta a la administración de aminoácidos y estímulos ambientales, actuando en poblaciones neuronales específicas que median la función reproductiva, puede proveer una importante información sobre posibles sistemas que actúan en la interfase entre el medio ambiente y el sistema de GnRH.

II. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1 Hipótesis

La suplementación de glutamato adelanta la pubertad, y tal escenario está positivamente relacionado a altos niveles de triyodotironina (T_3) en suero sanguíneo.

2.2 Objetivos

- Evaluar el efecto de la suplementación de glutamato sobre el inicio de la pubertad en cabras mestizas prepúberes en ambiente de zonas áridas.
- Evaluar el efecto de la suplementación de glutamato sobre los niveles séricos de T_3 (triyodotironina), como un indicador metabólico del inicio de la actividad reproductiva.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1 Las cabras en sistemas de subsistencia

Las cabras han prosperado principalmente en zonas de escasos recursos forrajeros como las zonas secas y montañosas de los países en desarrollo, teniendo una gran importancia para los campesinos de estas regiones, mejorando sus condiciones de vida. La importancia socio-económica de los pequeños rumiantes es ampliamente reconocida a nivel mundial. La cabra es la especie de ganado domesticado que ha tenido en los años recientes el crecimiento más elevado a nivel mundial en cuanto a número de animales, lo que se atribuye principalmente al crecimiento de la población humana en países en desarrollo (Boyazoglu *et al.*, 2005).

Las cabras presentan varios atributos: habilidad para pastorear y utilizar un amplio rango de forrajes y arbustivas de pobre calidad nutricional, habilidad para caminar distancias largas, intervalo generacional corto, alta tasa reproductiva, alta eficiencia energética en la producción de leche, utilización eficiente de áreas marginales y alto instinto gregario (Lebbie, 2004). Sin embargo, su potencial de producción está limitado por varios factores, como el uso de razas inapropiadas para ambientes degradados, sistemas de producción ineficientes e inapropiados, estrategias inadecuadas para mejorar el manejo de los recursos naturales y el ambiente (Devendra, 2001). Las cabras representan un componente muy importante de la ganadería en todas las zonas ecológicas y prácticamente en todos los sistemas de producción, encontrándose mayormente en los medios rurales pobres en donde sirven a propósitos múltiples.

Lebbie (2004) describe las características de una caprinocultura de subsistencia en África, las cuales, en casi todos los aspectos, aplican a las condiciones actuales de nuestro país.

Las cabras proporcionan alimentos; en el medio rural, proporcionan leche y carne a la gente más pobre. Contribuyen al empleo y estabilidad económica; el consumo de productos caprinos y las ventas de animales incrementan la estabilidad económica de los campesinos en tiempos en que no se obtienen ingresos de la agricultura, debido a las inclemencias climáticas, o bien, a fluctuaciones de la economía. Las cabras significan dinero efectivo y seguridad, ya que sirven como un recurso que, en casos de emergencia, pueden vender y así obtener dinero efectivo inmediato.

Las cabras utilizan áreas marginales; en África, aproximadamente la mitad del continente al sur del Sahara es desierto o agostadero árido y sabana. Bajo estas condiciones no es posible mantener una agricultura estable. Por lo tanto, en estas condiciones las comunidades dependen casi totalmente de animales locales, como las cabras, para subsistir bajo sistemas tradicionales nómadas y pastoriles trashumantes comunales. Todo lo anterior indica, por un lado, las bondades de las cabras pero, por otro lado, impone un reto para entender mejor esta actividad y sobre todo mejorarla.

3.2 Los factores ambientales y la respuesta fisiológica animal

No todos los ambientes son amenazantes para los animales. Existe evidencia de que un muy variado y estimulador ambiente puede ser benéfico y que ciertos cambios regulares en el ambiente son usados por los animales como señales diurnas y estacionales que influyen el comportamiento y patrones metabólicos. Por ejemplo, cambios en el fotoperiodo tienen profundas influencias sobre la actividad reproductiva y aseguran el nacimiento de las crías en la época del año que maximiza la disponibilidad de nutrientes para un rápido crecimiento de la cría. Esto ha demostrado que un ambiente estimulador puede ser benéfico a la producción animal. En contraste, cuando existe privación de estimulación ambiental, los animales

no pueden tener un comportamiento normal o un funcionamiento exitoso (Young, 1989).

La capacidad de un animal para hacer frente a nuevos ambientes se deriva de su capacidad para responder a las variables ambientales y mantener el equilibrio del organismo (homeostasis). Cada mecanismo de compensación depende y es una parte de un proceso de retroalimentación fisiológica. La severidad, esto es intensidad y duración de un cambio ambiental en relación con la capacidad de respuesta de los animales, determina el potencial de perturbación del equilibrio del animal y los recursos que deben ser invertidos para recuperar la homeostasis, lo que es conocido regularmente como retroalimentación negativa.

Para el proceso de retroalimentación negativa que se inicia, el factor de amenaza debe trascender la interfase medio ambiente-animal, entonces su efecto se detecta. Sensores especiales, como las orejas y los ojos, proporcionan una ventaja en la medida en que se es capaz de detectar situaciones de peligro antes de que alcancen el cuerpo, y el animal es capaz de responder antes de que exista alguna interrupción en la homeostasis (Young, 1989).

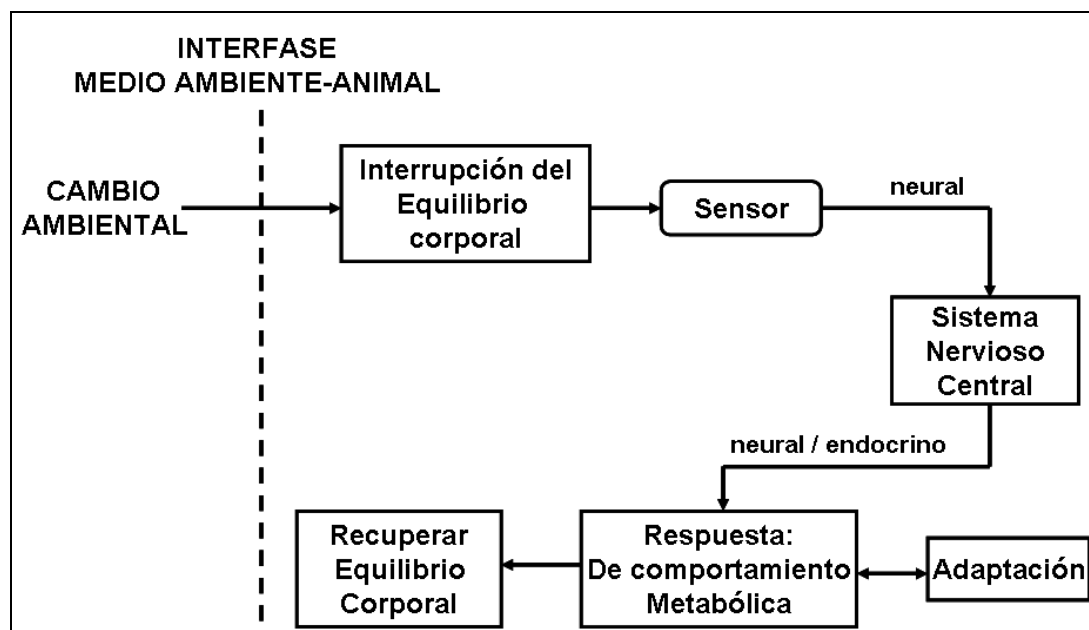


Figura 1. El proceso de retroalimentación negativa, ilustrando el mantenimiento del equilibrio corporal (homeostasis) en un animal sujeto a cambio ambiental.

Los mecanismos de respuesta metabólica y de comportamiento son activados y operan con diferentes plazos y función a nivel celular de todo el comportamiento animal. Aunque la mayoría de los cambios de comportamiento son inmediatos, cambios en patrones de comportamiento que involucran adaptación puede tomar mucho tiempo para desarrollarse (Young, 1989). La eficiencia de la producción animal, y las cuestiones fundamentales de la fisiología y la de salud que subyacen en la eficiencia de los animales están determinadas por las interacciones entre elementos medibles de la genética, la nutrición y el medio ambiente.

Un medio ambiente satisfactorio es el que satisface los siguientes cuatro criterios:

- Confort térmico: el ambiente no debe ser tan caliente ni tan frío como para afectar significativamente la producción o cause malestar.
- Confort físico: el espacio disponible para el animal y las superficies con las cuales hace contacto deben prevenir daño agudo o malestar crónico.
- Control de enfermedades: el ambiente debe minimizar las enfermedades, ya sea por restricción de dispersión de la infección o evitando el estrés responsable que disminuya la resistencia a la enfermedad, o ambos.
- Satisfacción de comportamiento: el animal no debe ser seriamente impedido de desarrollar la mayoría de patrones socialmente aceptables de comportamiento espontáneo que pueda desarrollar en un ambiente restringido. También debe estar libre de miedo.

Si estos son los criterios para un ambiente satisfactorio entonces el estrés ambiental se vuelve cualquier cosa que significativamente se aparta de estos criterios medidos por un disturbio en la fisiología normal, rendimiento, salud o comportamiento (Webster, 1983).

3.3 Influencia de los factores ambientales sobre la producción animal

El clima tiene obviamente efectos directos sobre la fisiología de los animales y por lo tanto su comportamiento, ecología y distribución. La temperatura ambiental y los regímenes de precipitación son dramáticamente variables. Hábitats cálidos son normalmente un problema para los animales cuando se componen de aridez, con altas temperaturas ambientales y baja humedad junto con el excesivo estrés por calor y el balance de agua (Willmer *et al.*, 2005).

La biología de los desiertos esta fuertemente dominada por la presencia o ausencia de agua, el establecimiento de las dinámicas de descanso, alimentación y reproducción para todos los animales y la imposición de un impredecible régimen que requiere estrategias adaptativas oportunistas. La vida parece proceder de una serie de pulsos de actividad con largos periodos de relativa inactividad en la flora y fauna. Para animales que dependen de partes efímeras de plantas, estos pulsos tienen un directo e inmediato impacto y las densidades de población de los animales pueden, por lo tanto, estar directamente relacionadas con la lluvia (Willmer *et al.*, 2005).

El balance y mantenimiento del equilibrio de agua puede considerarse como el problema clave de los animales terrestres interactuando con todos los demás aspectos de su vida y, sobre todo, requieren gran adaptación de la piel, los sistemas excretores, y el sistema respiratorio. Los problemas son siempre peores para los animales más pequeños, pero casi siempre para cualquier animal terrestre, la pérdida de agua debe ser minimizada (Willmer *et al.*, 2005).

Para cualquier animal sobre la tierra, todos los medios de intercambio de calor son variables. El calor puede ser fácilmente ganado por conducción y convección de superficies calidas, o mediante radiación directa del sol. El calor puede ser perdido mediante estos tres procesos por cualquier animal que se mueve hacia un área con

aire más fresco, lejos de superficies cálidas y fuera de la luz directa del sol; esta puede también ser perdida por evaporación (Willmer *et al.*, 2005).

Diferentes estrategias y soluciones tienden a operar en diferentes escalas. Animales pequeños pueden usar un considerable conjunto de adaptaciones de comportamiento para evitar el estrés térmico, mientras los animales mayores pueden tener técnicas fisiológicas y de comportamiento elaborado para mantener sus cuerpos a una preferida temperatura constante. La vida sobre la tierra, en lo referente a la temperatura, no sólo es una cuestión de incrementar la fisiología o la sofisticación bioquímica. Se trata de encontrar nuevos balances de fisiología y regulación del comportamiento, con el punto final común siendo una alertada y estable temperatura corporal a cualquier momento y cuando el animal esté activo (Willmer *et al.*, 2005).

Alta temperatura ambiental, con radiación solar alta directa e indirecta, velocidad del viento y humedad relativa causan la temperatura efectiva del ambiente a menudo superando la zona termoneutral de los animales (5 a 25°C), llevando a una situación de estrés calórico (Hayes *et al.*, 2003). El estrés calórico es uno de los factores limitantes en la producción lechera en climas cálidos siendo difícil de realizar para sistemas de granja que practican el pastoreo semiextensivo. Por ejemplo, las ovejas lecheras del Mediterráneo, usualmente están fuera durante todo el verano y son mantenidas encerradas sólo durante las noches del invierno o durante las pariciones. Además de la cantidad de leche, la composición y calidad puede ser afectada por el estrés calórico (Finocchiaro *et al.*, 2005).

Desde un punto de vista reproductivo, el estrés por calor inhibe el desarrollo folicular ovárico en mamíferos tales como animales domésticos, y éste puede contribuir a disminuir la eficiencia reproductiva durante el verano. En animales domésticos se ha encontrado que el estrés por calor reduce el tamaño del folículo dominante en el día 8 (Badinga *et al.* 1993) y entre los días 11 y 21 del ciclo estral (Wilson *et al.* 1998).

Se ha encontrado que el estrés calórico suprime la actividad de la aromatasa en células de la granulosa y disminuye las concentraciones de estradiol en el fluido folicular y plasma de vacas lecheras (Badinga *et al.* 1993). Además, tanto en vacas lactando y vaquillas, el estrés por calor disminuyó las concentraciones séricas de estradiol entre los días 11 y 21 del ciclo estral (Wilson *et al.* 1998). El estrés calórico estacional y agudo afecta la producción de esteroides en folículos dominantes en vacas (Wolfenson *et al.* 1997). Estos hallazgos demuestran que el estrés calórico afecta la viabilidad de las células de la granulosa y la capacidad estrogénica folicular.

El estrés calórico durante el último trimestre de gestación en vacas lecheras reduce el peso al nacer de las crías y la producción de leche durante la siguiente lactancia, después de que el tratamiento de estrés calórico ha terminado, fue relacionada linealmente con el peso al nacimiento de las terneras. Como el peso al nacimiento disminuyó, el rendimiento de leche de las madres estimado a 305 días disminuyó. El estrés calórico al final de la gestación incrementó las concentraciones de progesterona plasmática preparto, pero redujo las concentraciones plasmáticas preparto de sulfato de estrona, un esteroide de origen placentario. El estrés calórico tiene efectos agudos sobre la reproducción de ganado lechero y tiene efectos agudos y prolongados sobre la lactancia. Estos efectos de estrés térmico durante la gestación sobre la siguiente lactancia pueden ser el resultado de un estado endocrino alterado durante la preñez (Lewis *et al.*, 1984).

La baja fertilidad en el verano aproximadamente de 60% de las poblaciones de ganado lechero en el mundo, está asociada con altas temperaturas ambientales. Sin embargo, durante el otoño, cuando la temperatura del aire ha disminuido y las vacas no están expuestas tanto tiempo a estrés calórico, las tasa de concepción se mantienen más bajas que en el invierno, lo que se explica por el hecho de que los folículos ováricos son susceptibles al estrés calórico, ya que tarda de 40-50 días

para que los folículos antrales pequeños se desarrollen a folículos grandes dominantes. Por lo que la exposición a estrés calórico en el verano durante las etapas tempranas del desarrollo folicular puede afectar después la función folicular y disminuir la fertilidad en el otoño. Una marcada baja calidad de ovocitos colectados después del estrés calórico en verano se asocia con una baja capacidad de desarrollo de embriones in vitro durante el otoño. Alteraciones en el patrón de crecimiento y desarrollo de folículos de tamaño medio asociados con un marcado incremento en las concentraciones plasmáticas de FSH fueron encontradas durante la primera ola folicular del ciclo estral, subsiguiente a la exposición térmica (Roth *et al.*, 2001).

3.4 La Pubertad

Es definida como el periodo de transición entre un estado prepuberal y la etapa adulta durante la cual la función reproductiva es alcanzada. Durante este periodo las características sexuales aparecen, ocurre un crecimiento corporal acelerado, las gónadas empiezan a producir gametos maduros (espermatozoides u ovocitos) capaces de llevar a cabo la fertilización y los principales cambios fisiológicos ocurren. Cambios físicos y hormonales asociados con la pubertad han sido utilizados como signos de la maduración sexual (Terasawa y Fernández, 2001).

En humanos, la pubertad es típicamente iniciada al final de la primera o inicio de la segunda década de vida y su inicio es reconocido mediante la maduración de los genitales, desarrollo de características sexuales secundarias, aceleración en el crecimiento, cambios emocionales, y en la mujer, por la ocurrencia de la menstruación (Plant y Barker-Gibb, 2004).

La pubertad es la capacidad de la fertilidad, un proceso que abarca el desarrollo morfológico, fisiológico y de comportamiento. El incremento de la secreción hipotalámica del decapeptido hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es

esencial para la activación del eje pituitario gonadal en la pubertad. La red secretora de GnRH inicialmente se desarrolla y es temporalmente activa durante periodos especies-especifico del desarrollo fetal/neonatal, entonces la pubertad es la reactivación secundaria de un sistema existente.

Desde una perspectiva neurobiológica, el tiempo de la pubertad es, por lo tanto, una función de cambios en los sistemas neurales controlando la liberación de GnRH. La gran variabilidad entre individuos en el inicio y progresión de la pubertad indica que el tiempo de la pubertad no es simplemente una función de la edad cronológica. Más que eso, los sistemas neurotransmisores y neuromoduladores que impactan sobre la red secretora de GnRH transmiten información sobre los “combustibles” metabólicos, almacén de energía y desarrollo somático y para muchas especies, información sobre la estación y ambiente social.

En las últimas dos décadas, se ha vuelto aparente que la pubertad inicia cuando la liberación pulsátil de la hormona liberadora de LH (GnRH) incrementa. GnRH estimula la liberación en la pituitaria de LH (hormona luteinizante) y FSH (hormona folículo estimulante), las cuales son esenciales para la producción de gametos maduros y la secreción de esteroides gonadales. Por lo tanto, la pregunta de que ¿qué desencadena el inicio de la pubertad? se convierte en ¿qué desencadena el incremento puberal en la liberación de GnRH?, ya que el control de la liberación pulsátil de GnRH ocurre dentro del hipotálamo, la respuesta a esta última pregunta requiere un enfoque neurobiológico en modelos animales (Terasawa y Fernández, 2001).

3.4.1 ¿Cuándo madura el sistema neuronal GnRH?

3.4.1.1 Periodos embrional y fetal

En el ratón, en mono Rhesus y en el humano, los neurones de GnRH se originan del epitelio olfatorio durante el periodo de gestación. En el mono Rhesus, las células de

GnRH son encontradas en la cavidad olfatoria tan temprano como el día embrional (E) 32 (E32) y comúnmente en el E34-E36. Las células de GnRH migran a lo largo del tabique nasal y el nervio terminal, entran al cerebro anterior en E38, y subsecuentemente migran al hipotálamo basal del mono Rhesus en E47. El patrón de distribución básico de los neurones de GnRH en el cerebro está ya establecido en E55, aunque la migración celular de GnRH hacia el área preóptica (POA) y el hipotálamo continua después de E55 hasta el último trimestre. Los gonadotropos son encontrados en la pituitaria en E50, y los esteroides gonadales sexuales específicos son detectables en el cordón umbilical en E70, sugiriendo que las células de GnRH están funcionando en E50-E70. Sin embargo, la actividad de los neurones de GnRH pueden no ser elevada hasta terminar el ciclo; mRNA pro-GnRH es detectable en células de GnRH en E38-E50, pero no incrementa significativamente hasta E135 (Terasawa y Fernandez, 2001).

Las hormonas FSH y LH son detectables en la pituitaria del humano en la semana embrional (E) 10, y su contenido incrementa hasta la semana E 25-29. La pituitaria inicia la liberación de gonadotropinas hacia la circulación general por la semana E 25-29. Las gonadotropinas circulantes alcanzan niveles pico a la mitad de la gestación, y subsecuentemente tanto los niveles de LH y FSH declinan durante al final de la gestación. Los gonadotropos en el feto humano responden a GnRH mediante la liberación de LH y FSH tanto in vivo e in vitro. Una diferencia sexual en los niveles de gonadotropinas se aprecia durante la mitad de la gestación: el contenido de la pituitaria y las concentraciones circulantes de LH y FSH en fetos hembras son mayores que en fetos machos.

Dado que los niveles de testosterona circulantes son más altos en fetos machos en comparación con los niveles circulantes de estrógenos en fetos hembras durante la media gestación, tanto la diferencia sexual en los niveles de gonadotropinas y la disminución en los niveles de gonadotropinas hacia el final de la gestación en fetos

son atribuidos al desarrollo del mecanismo de retroalimentación negativa por las hormonas esteroides gonadales de las gónadas fetales, al igual que de la placenta. La retroalimentación negativa por esteroides gonadales es operativa en el feto de la hembra humana durante el final de la gestación, cuando la secreción de estrógenos es elevada. En fetos de ovejas, al final de la gestación, la liberación de LH es pulsátil, y la orquidectomía en machos, pero no la ovariectomía en hembras, resulta en un incremento en la amplitud del pulso de LH (Terasawa y Fernández, 2001).

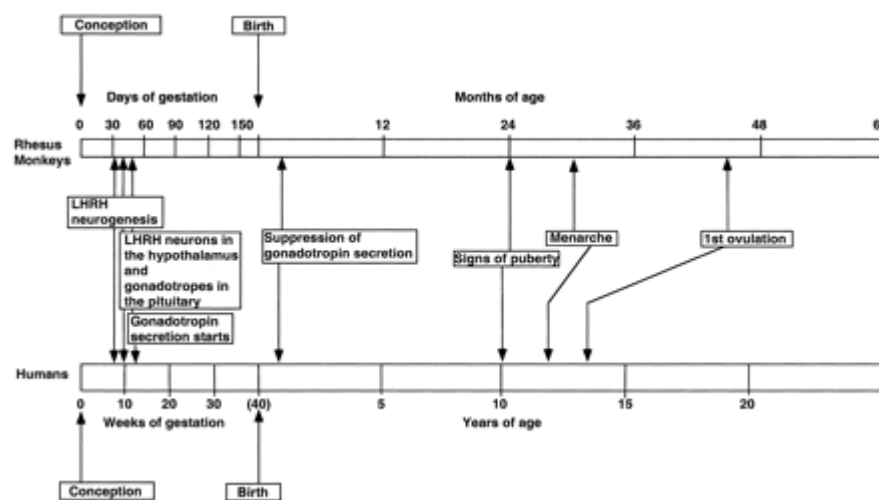


Figura 2. Ontogenia del sistema GnRH-Pituitario-Gonadal antes del nacimiento y hasta después del inicio de la pubertad en mono rhesus (arriba) y mujeres (abajo). Días y mese son usados como la escala para el periodo de gestación y después del nacimiento en monos, respectivamente, mientras que semanas y años son usados como la escala en humanos. La edad de eventos indicada en esta figura es aproximada.

3.4.1.2 Maduración postnatal

Aunque el patrón de distribución de los neurones de GnRH está ya establecido antes de del nacimiento en la mayoría de las especies en las cuales éste ha sido estudiado, la función, morfología, y biosíntesis así como la conectividad sináptica de los neurones de GnRH puede no estar madura hasta el tiempo de la pubertad. En ratas ha sido mostrado que el número de neurones con contorno rugoso incrementa, mientras el número de neurones de GnRH con contorno suave disminuye en la edad de la

pubertad. Además, en rata y ratón, los niveles de mRNA de GnRH incrementan gradualmente con la edad. Esto implica que los neurones de GnRH en roedores pueden recibir una innervación más intensa de otros neurones, y que la expresión del gen de GnRH madura después del nacimiento, pero antes de la pubertad. En contraste, en primates los neurones de GnRH están plenamente maduros antes del inicio de la pubertad: no existen diferencias en número o la forma de los neurones de GnRH o en los niveles de mRNA de GnRH entre monos en etapa juvenil y adulta (Terasawa y Fernández, 2001).

3.4.2 ¿Qué determina el tiempo de la pubertad?

Niveles circulantes de LH en mujeres neonatas incrementa abruptamente dentro de los primeros minutos después del nacimiento, seguido por un incremento en las concentraciones séricas de testosterona durante las primeras 3 a 21 horas. Altos niveles de LH en mujeres infantes declina dentro de los primeros 6 meses y se mantiene bajo hasta el inicio de la pubertad. Los niveles de FSH en mujeres son ligeramente altos en los primeros tres meses después del nacimiento, después de los cuales se vuelven bajos. Niveles circulantes de testosterona también son elevados de 2 a 4 meses post-nacimiento.

En contraste, en hembras neonatas los niveles de LH son sólo ligeramente elevados durante los primeros meses de vida, pero los niveles de FSH son altos los primeros 5 meses. Después de 6 meses de vida, los niveles circulantes de FSH, LH y esteroides gonadales son bajos y el sistema hipotálamo-hipófisis-gónadas entra en un estado de dormancia hasta el tiempo de la pubertad (Terasawa y Fernández, 2001).

Durante el inicio del periodo puberal, los niveles medios de FSH incrementan, seguido por un incremento en los niveles medios de LH. Niveles basales de LH y la amplitud y frecuencia de su pulsatilidad incrementa, y una fluctuación circadiana (incremento nocturno) de LH emerge. El incremento puberal en la liberación de gonadotropinas

estimula la secreción de estrógenos por el ovario (Terasawa et al., 1984). Estos cambios en el patrón de liberación pulsátil de LH durante la pubertad son el resultado de cambios en la pulsatilidad de GnRH, ya que la liberación pulsátil de GnRH también incrementa (Watanabe y Terasawa, 1989).

La frecuencia en la liberación pulsátil de GnRH incrementa al inicio de la pubertad y se mantiene elevada a través del periodo puberal, mientras la amplitud del pulso de liberación de GnRH incrementa en el periodo de transición entre prepubertad y pubertad y continua incrementando a través de la pubertad hasta que ocurre la primera ovulación (Watanabe y Terasawa, 1989, Chongthammakun et al., 1993). Estos hechos indican que los perfiles normales aparecen como cambios graduales a través de la pubertad y el desarrollo del sistema neurosecretor de GnRH, o su sistema regulador es esencial para el inicio de la pubertad (Plant y Barker-Gibb, 2004).

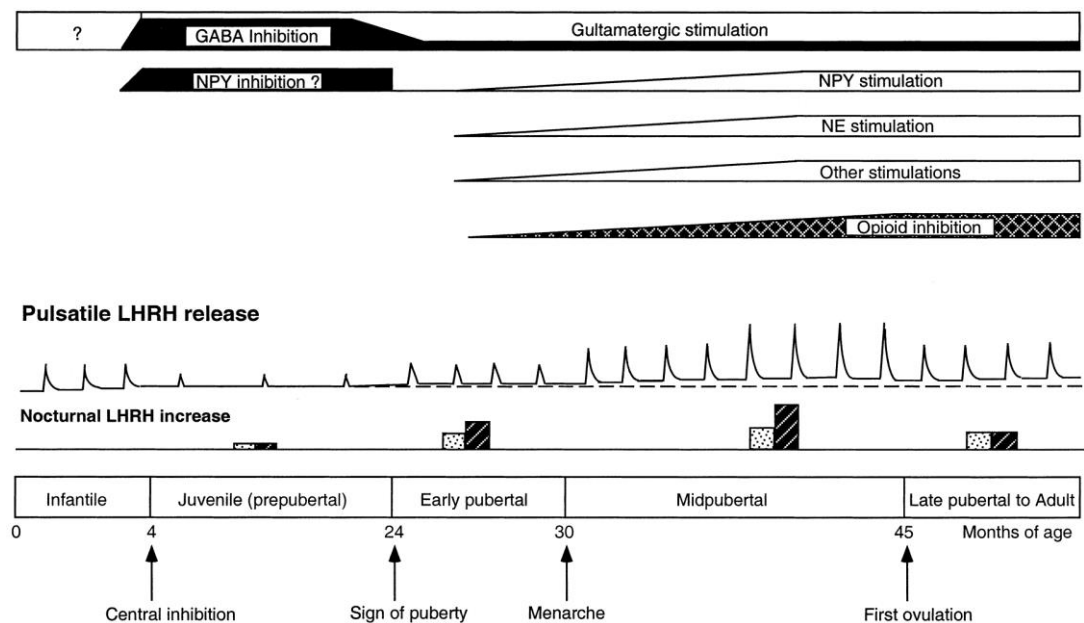


Figura 3. Representación esquemática de los cambios postnatales en la liberación de GnRH y eventos de neurotransmisión que ocurren en el hipotálamo en asociación con la pubertad en primates hembras no humanos.

3.4.3 La secreción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) es esencial para la pubertad

En términos neuroendocrinos, la pubertad es la reactivación de la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH). El rol necesario y suficiente de GnRH causando la pubertad en mamíferos se ha demostrado por la falta de la síntesis y liberación de gonadotropinas y el retardado desarrollo reproductivo, o la pérdida de la función reproductiva en el adulto cuando la acción de GnRH ha sido bloqueada con inmunoneutralización, tratamiento con antagonistas de GnRH o mediante el tratamiento de agonistas, los cuales paradójicamente subregulan la actividad secretora de los gonadotropos en la glándula pituitaria (Ebling, 2005).

El requerimiento absoluto para la reproducción implica que el eje hipotálamo-pituitario-gonadal, controlando la fertilidad, es un robusto mecanismo evolucionario. Los neurones de GnRH del hipotálamo representan el tipo celular clave dentro del cuerpo dictando la fertilidad. Sin embargo, el nivel de redundancia funcional dentro de la población de neurones de GnRH es desconocido.

Como un resultado de un evento fortuito de inserción transgénica, el gen de ratón GNR23 exhibió una marcada reducción alelo-dependiente de neurones de GnRH dentro de su cerebro. El ratón tipo Salvaje tuvo aproximadamente 600 neurones de GnRH, comparados con aproximadamente 200 (34%) y aproximadamente 70 (12%) en los genes GNR23^{+/-} y GNR23^{-/-}, de ratón, respectivamente. Al usar estos ratones para examinar los mínimos requerimientos de neurones de GnRH para la fertilidad, el ratón macho GNR23^{-/-} exhibió fertilidad normal. En contraste, la hembra GNR23^{-/-} fue marcadamente subfétil, siendo incapaz en producir camadas normales, ciclo estral, u ovulación.

La falla en la ovulación resultó de una inhabilidad de los pocos neurones de GnRH existentes para generar el pico de LH. Sin embargo, esto no fue el caso para el primer ciclo normal a la pubertad. Esto demuestra que 12% de las poblaciones de

neuronas de GnRH son suficientes para la secreción pulsátil de gonadotropinas, mientras que entre 12% y 34% son requeridos para el control cíclico en el ratón hembra adulto. Esto indica que existe redundancia substancial dentro de la población neuronal de GnRH y sugiere que la gran mayoría de neuronas de GnRH deben ser disfuncionales antes de que la fertilidad sea afectada (Herbison, *et al.*, 2007).

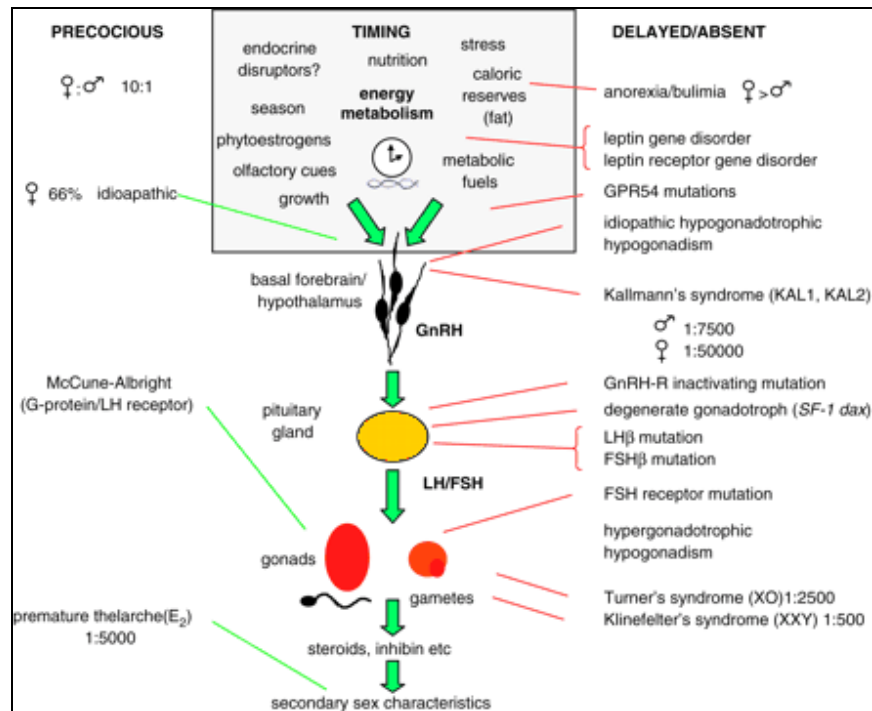


Figura 4. El tiempo de la pubertad está en función del control de la secreción de GnRH, reflejando la integración de múltiples señales internas y externas sobre un proceso determinado genéticamente. Algunos desórdenes mayores del tiempo de la pubertad indican que reflejan disfunción a diferentes niveles del eje hipotálamo-pituitario-gonadal. E₂, estradiol; FSH, hormona folículo estimulante, GnRH-R, receptor de la hormona liberadora de gonadotropinas.

3.4.4 Desarrollo del sistema secretor de GnRH

Una característica remarcable del sistema secretor de GnRH es que la población clave de neuronas de GnRH se origina en el periodo embrional fuera del sistema nervioso central en la placa olfatoria media (Tobet *et al.*, 2001). Estas células subsecuentemente migran de la región nasal hacia el cerebro, de tal manera que la célula soma neuronal, la cual constituye el sistema secretor GnRH en el mamífero adulto, está dispersa en una secuencia rostro-caudal a través del cerebro anterior

basal del tabique medial al hipotálamo medio basal. La mayoría de las células corporales son encontradas en áreas rostrales, particularmente el tabique medial, la banda diagonal de la Broca, y en el área preóptica (POA) a nivel del órgano vascular de la lamina terminal (OVLT).

En primates y hombre, una proporción del perikaria (parte de un neurón conteniendo el núcleo) de GnRH-inmunoreactivo está también localizado más caudalmente en el área retroquiasmática y en el hipotálamo medio basal y el núcleo arqueado. Estudios en regresión de rastreo revelan que la gran mayoría de los neurones de GnRH desarrollan proyecciones axonales a los lechos capilares del OVLT y la eminencia media, aunque ramificaciones extensivas también resultan en innervación de sitios del cerebro medio donde ha sido hipotetizado que GnRH facilita ciertos comportamientos reproductivos. Estas observaciones llevan a ver que el principal rol del GnRH, al menos en el periodo postnatal, es vía secreción hacia la circulación portal pituitaria para regular finalmente la función pituitaria gonadotrópica (Ebling, 2005).

3.4.5 La pubertad es una reactivación de la secreción de GnRH

El desarrollo anatómico del sistema secretor de GnRH ocurre relativamente temprano en la vida, y la capacidad sintética está presente antes de la pubertad en el que la expresión del mRNA del GnRH alcanza niveles presentes en los adultos. En algunas especies el sistema secretor de GnRH está indudablemente activo en el periodo fetal medio o periodo neonatal. Estudios en fetos de ovejas revelan que la hormona luteinizante (LH) es liberada en una manera pulsátil durante el periodo medio de la preñez, y la frecuencia de los pulsos incrementan si los testículos del feto son removidos. Es altamente probable que la liberación episódica de LH refleje la liberación pulsátil de GnRH del hipotálamo fetal (Ebling, 2005).

De hecho, el bloqueo farmacológico de la acción de GnRH en fetos de corderos resulta en una sustancial reducción en el volumen testicular en la vida posterior,

evidenciando que la activación de la secreción temprana de GnRH en la vida es importante en el desarrollo testicular. En primates machos incluyendo humanos, existen periodos de activación tanto en el periodo fetal y en el muy temprano periodo neonatal. Estos periodos tempranos de activación del sistema secretor de GnRH pueden ser importantes para la masculinización del cerebro, desarrollo del comportamiento sexual subsiguiente y control de la proliferación de las células de Sertoli en los testículos. En primates hembras, parece que un bajo nivel de actividad del sistema secretor de GnRH está presente a través del periodo juvenil (Ebling, 2005).

El nacimiento es un evento arbitrario en el desarrollo de un organismo, entonces, los periodos de activación de secreción de GnRH que ocurren prenatalmente en especies precoces tales como las ovejas, pueden ser equivalentes a los periodos postnatales de activación en especies altriciales (especies que requieren alimentación ya que son incapaces de moverse por su propia cuenta después de haber nacido) como el ratón. En general, la rapidez de crecimiento y desarrollo en mamíferos con un corto periodo de vida, por ejemplo familias de ratas y ratones de laboratorio, es tal que el periodo inicial fetal/neonatal de activación es continuo e indistinguible de la activación puberal subsiguiente del eje hipotálamo-pituitario-gonadal, por lo tanto, no existe pausa juvenil como en mamíferos mayores con largos periodos de vida (Ebling, 2005).

Sin embargo, algunos pequeños mamíferos pueden mostrar periodos de inactividad juvenil reproductiva, particularmente cuando la reactivación de la secreción de GnRH es interrumpida por factores ambientales, como cambios en el fotoperiodo. Hámsteres Siberianos rápidamente crecen e inician la pubertad cuando son criados con fotoperiodos largos, pero mantienen una pausa juvenil en el desarrollo cuando son expuestos a fotoperiodos cortos señalizando el inicio del invierno (Ebling, 2005).

Ya que la capacidad de síntesis de los neurones de GnRH no es limitante para que la pubertad proceda y un periodo de secreción endógena ha ocurrido ya en el desarrollo temprano, la pubertad puede ser visualizada como una reactivación de la secreción de GnRH. Una gran atención ha sido en el tema de si el sistema secretor de GnRH es activamente inhibido durante el periodo prepuberal, o está simplemente en dormancia, esperando adquirir entradas estimuladoras (Ebling, 2005).

El concepto de la “gonadostática” ha surgido; éste sugiere que los bajos niveles de andrógenos/estrógenos liberados por los testículos y ovarios prepuberales ejercen efectos de retroalimentación negativa que inhiben la liberación de GnRH previo a la pubertad. Aunque no hay duda de que tal mecanismo de retroalimentación homeostática juega un papel esencial en la regulación del eje reproductivo, y es claro que la disminución en la secreción de GnRH en el primate neonatal, y la primera activación de la secreción de GnRH en el periodo juvenil son procesos que son independientes de la retroalimentación de esteroides gonadales (Ebling, 2005).

Esto ha sido demostrado por la disminución en la secreción de gonadotropinas después del periodo neonatal y el posterior incremento en el periodo juvenil en el mono Rhesus que ha sido castrado al nacimiento, para remover cualquier influencia de confusión de la retroalimentación de esteroides gonadales (Plant, 1985). Sin embargo, el incremento juvenil en la secreción de gonadotropinas en animales agonadales ocurre más temprano que en monos gonadalmente intactos, lo cual demuestra que los mecanismos de retroalimentación de esteroides también juegan un papel en las últimas etapas de la maduración puberal (Ebling, 2005).

En el periodo juvenil existe una disminución progresiva en la sensibilidad a los efectos de retroalimentación de andrógenos y estrógenos. La alta sensibilidad al inicio del proceso de la pubertad explica el por qué los ciclos iniciales menstrual/estro son a menudo anovulatorios, o consisten de fases lúteas cortas o inadecuada función lútea. Probablemente, más que considerar la “gonadostática” como un mecanismo causal

para la pubertad, éste debe ser visto como el reajuste necesario de los circuitos de retroalimentación de esteroides gonadales, los cuales permiten la total actividad testicular y ovárica para el desarrollo (Rapisarda *et al.* 1983).

La capacidad para esta reactivación existe a lo largo del periodo de reposo puberal, como estimulación eléctrica y neuroquímica del hipotálamo mostrando liberar LH e inferir en el GnRH. Por ejemplo, el tratamiento con el agonista de glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA) rápidamente induce la secreción de LH en un amplio rango de especies prepúberes, incluyendo primates, ovejas y roedores (Ebling and Cronin 1998). Tratamientos con agonistas receptores de GnRH bloquean el efecto de NMDA, indicando una probable acción sobre la liberación de GnRH más que una acción directa sobre la glándula pituitaria. Más aún, en ovejas adultas, los NMDA han mostrado incrementar las concentraciones de GnRH en los capilares portales drenando la eminencia media (Viguie *et al.*, 1995).

Tal evidencia de que el sistema secretor de GnRH puede ser manejado por activación exógena apoya la visión de que la estimulación endógena de liberación de GnRH es el paso limitante para la pubertad. El neurón de GnRH puede ser visto, por lo tanto, como un elemento muy pasivo en el proceso puberal en el que su secreción es completamente dependiente sobre las entradas de centros mayores (Ebling, 2005).

3.5 El gen Kiss-1

El gen Kiss1 fue originalmente identificado por científicos en Hershey, PA, quienes observaron que su expresión en células de tumor fue restringido a células que aparentemente fueron no metastáticas (Lee, 1996). Por lo tanto, el gen parece ser una secuencia supresora debido a sus propiedades antimetastáticas y nombrado Kiss1 en honor de otro producto famoso de la compañía de chocolates Hershey, el kiss. El gen Kiss1 codifica una proteína de 145 aminoácidos que es enzimáticamente

cortada en un péptido de 54 aminoácidos, conocido como Kisspeptina-54 o metastina, así mismo, péptidos cortados de 14, 13 o 10 aminoácidos, son referidos colectivamente como kisspeptinas.

Además de células de tumor, la expresión de kisspeptina ha sido detectada en el hipotálamo y la placenta, donde puede contribuir para la regulación de la implantación. Kisspeptina es un enlace del receptor conocido como GPR54 (también como OT7T175 o AXOR12) (Muir, 2001). Recientes observaciones sobre el rol de Kiss-1 en el control de la secreción de LH proveen una evidencia sólida para un efecto estimulatorio de Kiss-1 sobre la liberación de FSH, actuando a nivel central. En general, se ha propuesto que el sistema Kiss-1/GPR54 es un novedoso elemento central en la cascada de eventos de la red neuroendocrina que gobiernan la secreción de gonadotropinas.

Las gonadotropinas de la pituitaria, LH y FSH, son hormonas glicoproteicas estructuralmente relacionadas, las cuales desempeñan papeles centrales en el desarrollo y regulación funcional de las gónadas, tanto en hembras como en machos. Específicamente funciones gonadales, tales como desarrollo folicular y secreción de estradiol en el ovario y proliferación de las células de Sertoli y la espermatogénesis en los testículos; son críticamente dependientes sobre la FSH de la pituitaria. La secreción de ambas gonadotropinas es manejada por GnRH, también llamado GnRH-I, cuyo patrón de liberación pulsátil es regulado en turno por una multitud de eventos centrales y periféricos.

En relación a los reguladores centrales, un amplio arreglo de circuitos excitadores e inhibidores gobernando la secreción de GnRH, han sido identificados en las últimas décadas. Aunque, es probable que adicionales reguladores centrales hasta ahora desconocidos contribuyan en el control preciso de la secreción de GnRH-gonadotropinas. En este contexto, inesperadamente una faceta reproductiva de este nuevo sistema descubierto ha surgido recientemente y la caracterización del papel

del sistema Kiss-1/GPR54 en el control neuroendocrino de la secreción de gonadotropinas ha sido iniciada (Navarro, 2004).

3.5.1 El receptor GPR54

GPR54 fue un receptor “huérfano” acoplado a la proteína-G, de significancia desconocida hasta que se estableció que tiene una alta afinidad para kisspeptina. Aunque este par ligando y receptor inicialmente llamaron la atención de científicos estudiando la biología del cáncer, una sorprendente revelación en 2003 expuso otra importante función de la señalización de kisspeptina a través de GPR54. Humanos adultos y ratones, ambos con GPR54 no funcional, exhiben bajos niveles plasmáticos de gonadotropinas y esteroides sexuales, gónadas subdesarrolladas e infertilidad (Dungan *et al.*, 2005).

El hipogonadismo hipogonadotrópico (HH) es caracterizado por una falla secundaria de la función gonadal por una deficiente secreción de gonadotropinas, resultando de un defecto hipotalámico o de la pituitaria. La asociación de HH con anosmia (perdida o disminución del sentido del olfato) llamado síndrome de Kallmann, es debido a la falla del nervio vomeronasal y los neurones de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) para migrar correctamente durante el desarrollo. HH en pacientes con un sentido del olfato normal es definido como HH idiopático (iHH). La patogénesis de iHH es desconocida, pero mutaciones en diferentes genes involucrados en el funcionamiento del eje hipotalámico-pituitario-gonadal HPG han sido implicadas (Iovane *et al.*, 2004).

Ha sido descubierto recientemente que el GPR54 es vital para la función del eje reproductivo. Mutaciones del GPR54 pueden resultar en HH. Dos estudios independientes investigando la base genética de iHH en familias consanguíneas separadas identificaron mutaciones en el receptor GPR54 como la causa de HH en estas familias. Además, varias mutaciones no familiares han sido identificadas. Las

células transfectadas con cierto receptor mutante mostraron una máxima disminución en IP₃ (inositol trifosfato) o respuesta del flujo de calcio a kisspeptina-10. Además, polimorfismos por encima del gen de *GPR54* pueden estar relacionados al retraso constitucional del crecimiento y la pubertad (Murphy, 2005).

Ratones deficientes en *GPR54* (*GPR54*^{-/-}) también tienen desarrollo sexual anormal y baja concentración de gonadotropinas circulando, y son incapaces de reproducirse. Sus órganos reproductivos internos y externos son anormales y sustancialmente reducidos en tamaño. Las diferencias histopatológicas en *GPR54*^{-/-} de ratón no son visibles al día 16.5 post coito, sugiriendo que el papel de *GPR54* en el desarrollo sexual ocurre postnatalmente, pero antes de la pubertad (Murphy, 2005).

3.5.2 Las Kisspeptinas y el GPR54 como señalizadores de la pubertad

El gen *Kiss1* codifica una familia de péptidos llamados Kisspeptinas, las cuales se enlazan a la proteína G acoplada al receptor 54 (*GPR54*). Las Kisspeptinas y su receptor son expresadas en el cerebro anterior, y el descubrimiento de que la falta en el ratón y en el humano de un *GPR54* funcional inhibe la pubertad y se presenta hipogonadismo hipogonadotrópico (HH), implicando que la señalización de la kisspeptina tiene una función esencial en la reproducción. Estudios en diferentes especies de mamíferos han mostrado que las Kisspeptinas estimulan la secreción de gonadotropinas de la pituitaria por estimulación de la liberación de GnRH del cerebro anterior después de la activación del *GPR54*, el cual es expresado por neuronas de GnRH (Dungan *et al.*, 2005).

La kisspeptina se expresa abundantemente en el núcleo arqueado (Arc) y en el núcleo periventricular anteroventral (AVPV) del cerebro anterior. Tanto estradiol y testosterona regulan la expresión del gen *Kiss-1* en el Arc y AVPV; sin embargo, la respuesta del gen *Kiss-1* a estos esteroides es exactamente opuesta entre estos

núcleos. Estradiol y progesterona regulan negativamente el mRNA de Kiss-1 en el Arc y regulan positivamente su expresión en el AVPV. Por lo tanto, los neurones de Kisspeptina en el AVPV pueden contribuir generando el pico preovulatorio de gonadotropinas en la hembra. Niveles hipotalámicos de Kiss-1 y mRNA de GPR54 incrementan dramáticamente en la pubertad, sugiriendo que kisspeptina puede mediar los eventos neuroendocrinos que desencadenan el inicio de la pubertad. Junto a estas observaciones se demuestra que la señalización Kisspeptina-GPR54 en el cerebro sirve como un importante conducto para el control de la secreción de GnRH en el animal en desarrollo y adulto (Dungan *et al.*, 2005).

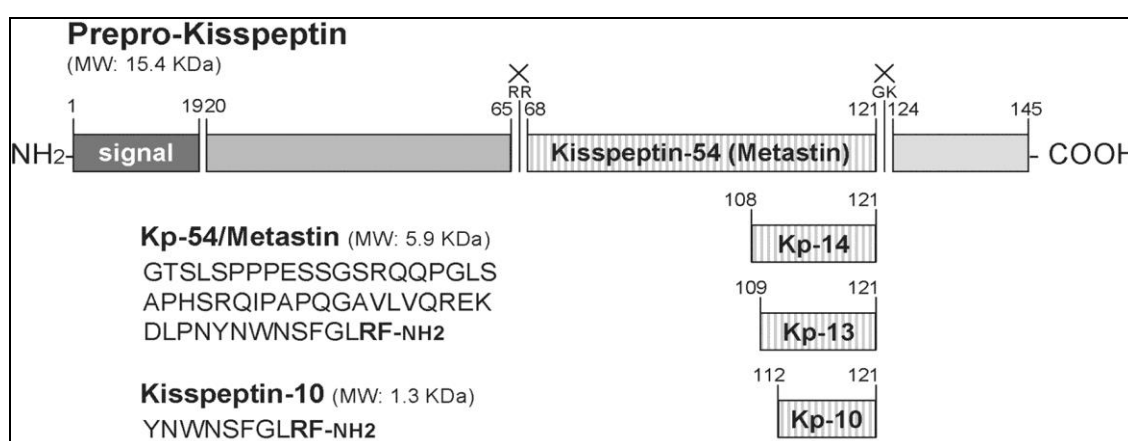


Figura 5. Características estructurales de Kisspeptinas de humanos, generadas mediante corte se forma un precursor común, la pre-pro-kisspeptina. La prepro-kisspeptina, codificada por el gen *KiSS-1*, es una proteína de 145-amino-ácidos que contiene un péptido señal de 19-amino-ácidos y una región central de 54-amino-ácidos, acompañados por dos sitios de corte (denotados por X), los cuales dan origen a metastina o kisspeptina-54. Cortes posteriores de metastina genera kisspeptinas de bajo peso molecular: kisspeptina-14 (Kp-14), Kp-13 y Kp-10. Todas las Kisspeptinas son capaces de enlazarse y activar el GPR54. También la organización estructural general, la secuencia de aminoácidos completa de metastina y kisspeptina-10 humana es mostrada. La región C-terminal RF-amida, es el sello de la superfamilia de este péptido, indicado en negritas (Tena-Sempere, 2005).

El sistema Kiss-1/GPR54 es un regulador indispensable del eje reproductivo, cuya función es esencial para el inicio de la pubertad y la apropiada secreción de GnRH y gonadotropinas. Aunque la caracterización fisiológica de este sistema es aún incompleta, los datos disponibles permiten plantear la hipótesis de que los neurones

mantienen una posición central en la regulación de la cascada de señales y circuitos controlando el sistema GnRH (Dungan *et al.*, 2006).

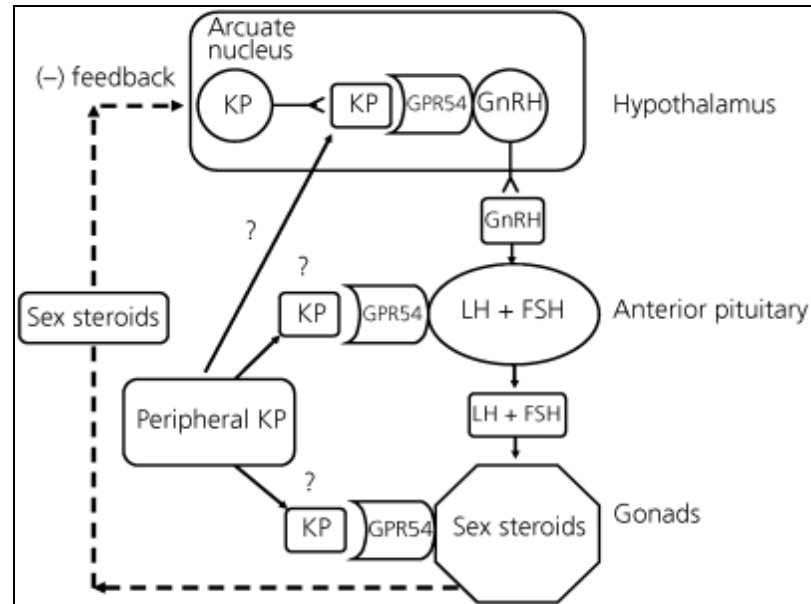


Figura 6. Representación esquemática del papel de kisspeptina (KP) en el eje hipotálamico pituitario gonadal.

3.5.3 Los Neuronas de Kisspeptinas como reguladores centrales

La señalización de las Kisspeptinas es un componente esencial del eje neuroendocrino reproductivo y es consistente con la hipótesis de que los neuronas de Kisspeptinas en el cerebro anterior actúan como protectores moleculares para la activación de la pubertad y la coordinación de la actividad reproductiva en la edad adulta. Los neuronas de Kisspeptinas son blancos directos de los esteroides gonadales y pueden estar involucrados tanto en la retroalimentación negativa y positiva de la secreción de gonadotropinas. Un modelo simplificado del circuito involucrado en este proceso se ilustra en la figura 6. Factores metabólicos y ambientales son también conocidos por jugar un importante papel en la regulación del eje hipotalámico-pituitario-gonadal. Como los neuronas de Kisspeptinas son utilizados como un enlace celular entre el metabolismo y la reproducción (se muestra en la figura 7). Esta posibilidad ha sido poco explorada, pero la evidencia reciente indica que las Kisspeptinas

pueden estar involucradas en la mediación al menos de algunos efectos del estado metabólico corporal sobre la reproducción.

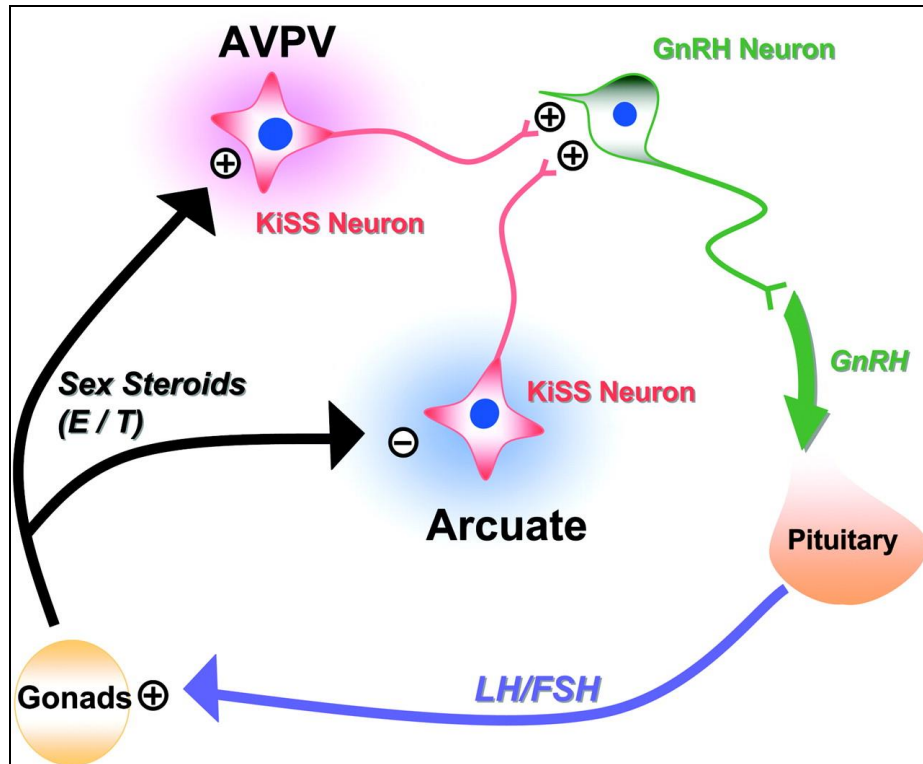


Figura 7. Las Kisspeptinas estimulan el eje neuroendocrino reproductivo, y los esteroides sexuales diferencialmente regulan la expresión de mRNA de *Kiss-1* en diferentes núcleos en el cerebro anterior. Las Kisspeptinas liberadas por los neurones en el AVPV y Arc estimulan la liberación de GnRH, el cual induce la liberación de LH y FSH. Las gónadas responden a las gonadotropinas mediante la secreción de esteroides sexuales, los cuales entonces retroalimentan para regular la actividad de los neurones de Kisspeptinas, inhibiendo la expresión de *Kiss-1* en el AVPV. El efecto inductivo de los esteroides sexuales sobre la expresión de *Kiss-1* en el AVPV puede contribuir a el pico preovulatorio de LH en hembras (y posiblemente T-mediando el comportamiento sexual en el macho).

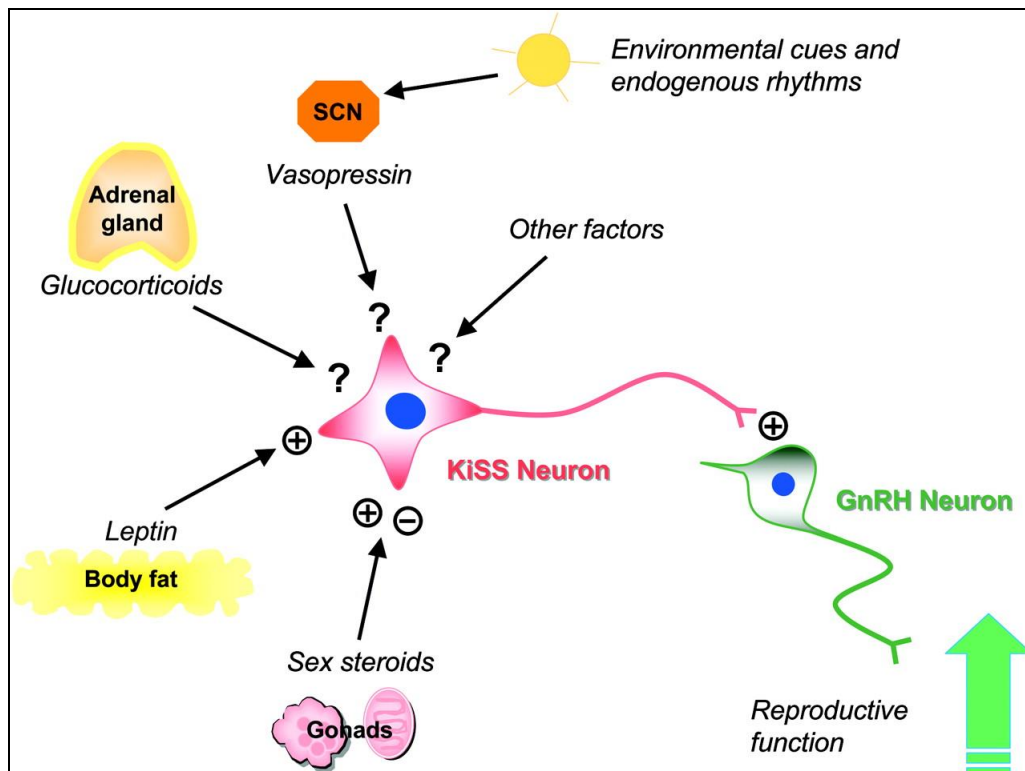


Figura 8. Los neurones de Kisspeptinas pueden actuar como procesadores centrales para las señales transmitidas de la periferia a los neurones de GnRH. Factores metabólicos y ambientales regulan la función reproductiva, los cuales aseguran que la reproducción proceda solo cuando las condiciones metabólicas y ambientales son favorables. Las Kisspeptinas estimulan la secreción de GnRH, y el mRNA de *Kiss-1* es regulado negativa y positivamente por esteroides sexuales (ver figura de arriba y texto para detalles). La expresión de *Kiss-1* puede ser inducida por leptina, cuyos niveles plasmáticos reflejan el estado de las reservas metabólicas. Los neurones de kisspeptina pueden también recibir entradas del eje hipotalámico-pituitario-adrenal y de señales ambientales, tales como el fotoperíodo vía el núcleo supraquiasmático del hipotálamo (SCN).

Es ampliamente reconocido que el estado nutricional y la disponibilidad de reservas de energía pueden tener un profundo impacto sobre la función reproductiva. La restricción de alimento tiene un efecto inhibitorio sobre la fertilidad, evidenciado por una disminuida circulación de gonadotropinas y anovulación. Información sobre la disponibilidad de reservas de energía es transmitida al hipotálamo por leptina, una citoquina secretada por tejido adiposo blanco, al igual que otras hormonas metabólicas tales como insulina (Schneider, 2004). Recientemente se demostró que la

expresión del mRNA de Kiss-1 es disminuida en ratas en ayuno comparadas con ratas alimentadas a libre acceso y que la supresión del inicio de la pubertad (indicado mediante la apertura vaginal) que acompaña el estado de ayuno puede ser corregido mediante la administración de kisspeptina. Estos resultados sugieren que los neurones de kisspeptina son mediadores en la cascada de los efectos positivos de la leptina sobre la secreción de gonadotropinas (Castellano *et al.*, 2005).

Estudios sobre la interacción de Kisspeptina y GPR54 con adipocitoquinas y hormonas adrenales pueden ilustrar el funcionamiento del eje hipotalámico-pituitario-gonadal antes y después de la pubertad. La relación entre kisspeptina y la acción de otras sustancias endógenas secretoras de GnRH, tales como glutamato, péptido análogo a galanina, y vasopresina, son merecedores de exploración, debido a que es concebible que los efectos de estos neurotransmisores sobre la secreción de GnRH esté mediada a través de la señalización kisspeptina-GPR54. En conclusión, la vía kisspeptina-GPR54 desempeñan un papel vital en la regulación neuroendocrina en los mamíferos (macho y hembra; Dungan *et al.*, 2005).

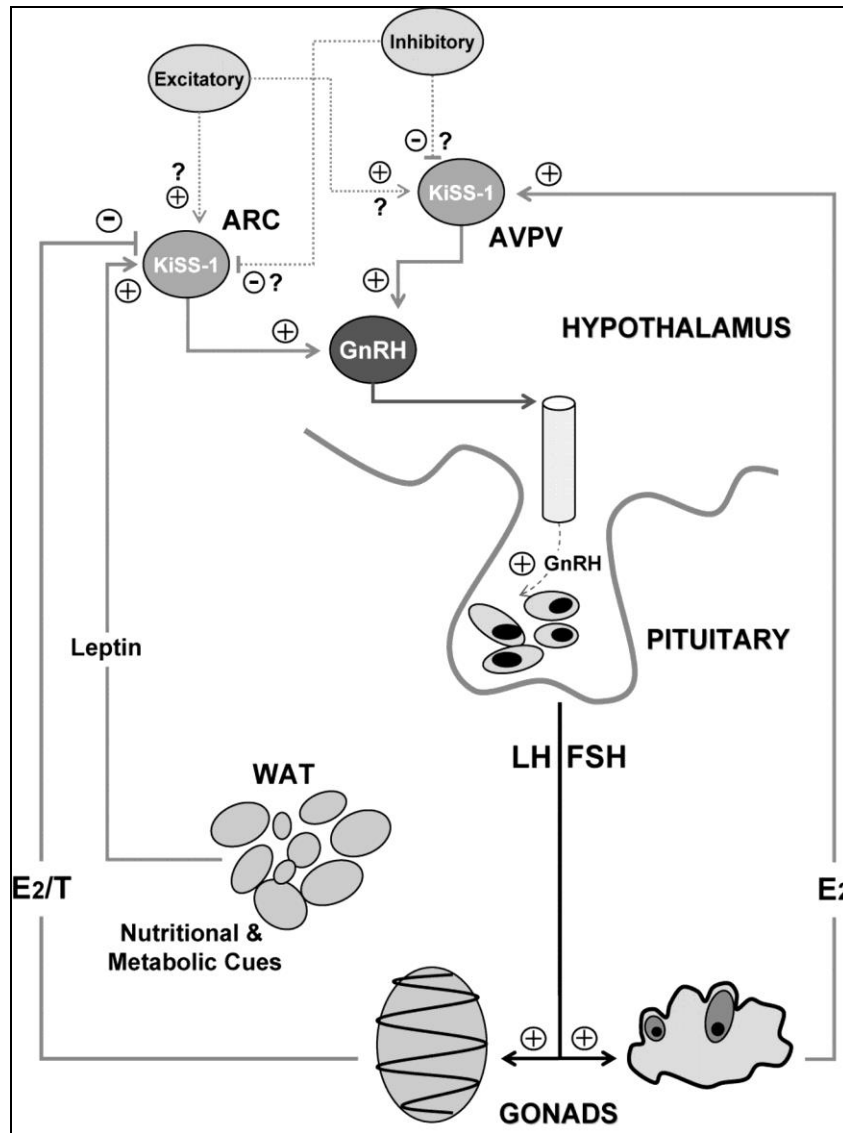


Figura 9: Modelo teórico para el papel de los neurones de Kiss-1 como integradores clave en la red central controlando la secreción de GnRH y por lo tanto el eje gonadotrópico. Reguladores periferales centrales del eje gonadotrópico parecen operar a través de la modulación del sistema Kiss-1. Estos incluyen esteroides gonadales como estrógenos (E₂) y testosterona (T), que han sido probados regular la expresión del gen Kiss-1 en el hipotálamo. La regulación de la expresión de Kiss-1 mediante esteroides, parece tener núcleos específicos, debido a que andrógenos y estrógenos suprimen los niveles de mRNA de Kiss-1 en el ARC, aunque los estrógenos incrementan la expresión del gen Kiss-1 en el AVPV, por lo tanto, proveen la base potencial para el control de retroalimentación negativa y positiva de la secreción de gonadotropinas. Además, el estatus nutricional modula la expresión y función del sistema Kiss-1 en el hipotálamo, probablemente a través de leptina (producida por el tejido adiposo WAT) y/o señales metabólicas. Todos los modelos emergentes postulan que las Kisspeptinas y el GPR54 en el hipotálamo son protectores moleculares esenciales de la función reproductiva (Tena-Sempere, 2005).

3.6 El sistema aminoácidos excitadores: Descripción y localización en tejidos neuroendocrinos

Con más de 23 proteínas receptores, no incluyendo variantes redundantes, cuatro proteínas transportadoras, y varios posibles vínculos endógenos, el sistema de neurotransmisión EAA es un sistema excesivamente complejo. Sin embargo, por virtud de esta diversidad, está bien establecido que desempeñan múltiples funciones reguladoras por las cuales ha sido asignado en el CNS. La figura 9 ilustra varios de los componentes que comprenden el sistema de neurotransmisión EAA. Los tres principales componentes del sistema (vínculos endógenos, proteínas receptoras, y proteínas transportadoras) se describen enseguida (Brann y Mahesh, 1997).

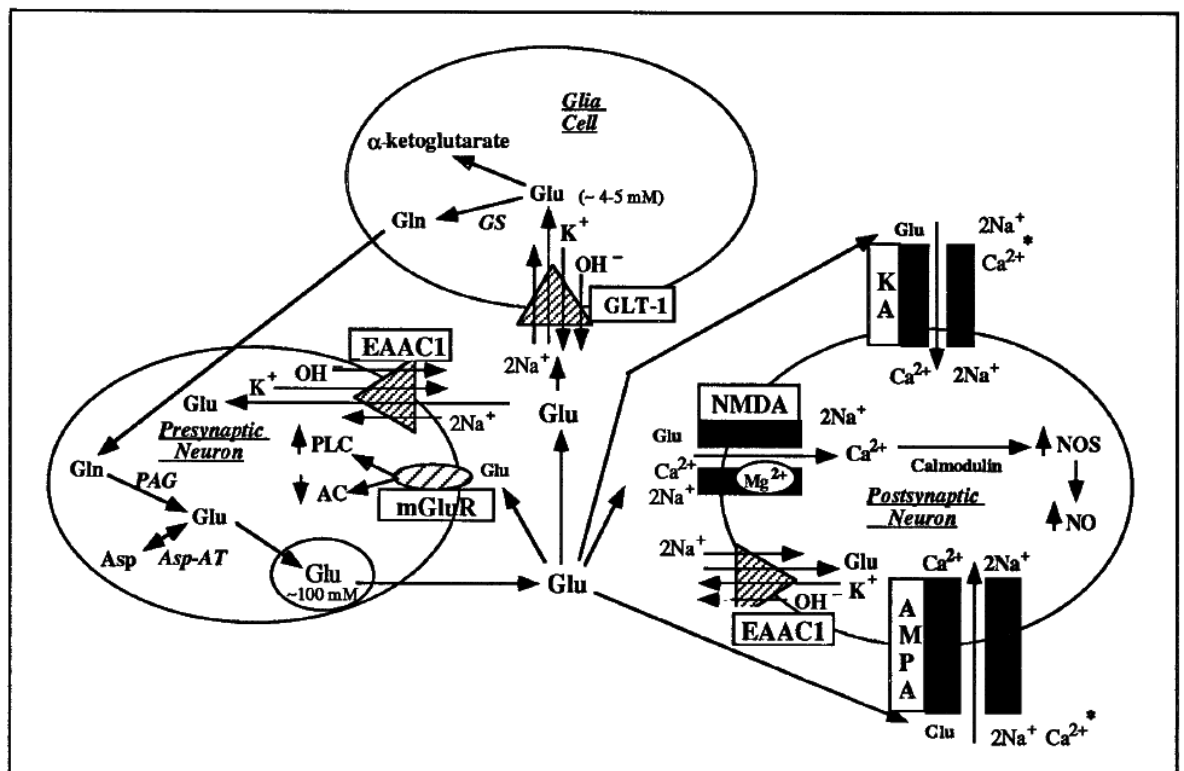


Figura 10: Resumen del sistema EAA. El neurotransmisor glutamato es almacenado en las terminales sinápticas en el neurón presináptico. Por depolarización del neurón presináptico, el glutamato es liberado de las terminales nerviosas presinápticas, por exocitosis, en una manera ATP y calcio dependiente. Una vez en la hendidura sináptica, el glutamato se puede enlazar a receptores EAA ionotrópicos (NMDA, Kainato, o AMPA) sobre el neurón presináptico. Esto resulta en la activación de del canal iónico asociado con el receptor EAA para inducir flujo de iones y depolarización del neurón postsináptico. El glutamato puede también enlazar a receptores EAA

metabotrópicos sobre el neurón presináptico para prolongar la liberación de glutamato. La finalización de la neurotransmisión de glutamato se cree ocurre a través de la remoción de glutamato de la hendidura sináptica mediante proteínas transportadoras (GLT-1, EAAC1) las cuales están sobre células gliales y neuronales, respectivamente. También existen otros transportadores no ilustrados en el diagrama: GLAST- 1 y EAAC-4. Abreviaciones: AC, adenilato ciclasa; AMPA, ácido alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propionico; Asp, aspartato, Asp-AT, aminotransferasa aspartato; Glu, glutamato; Gln, glutamina; GS, glutamina sintetasa; mGluR, receptor metabotrópico AAE; NMDA, N-metil-D-aspartato; NO, óxido nítrico; NOS, óxido nítrico sintetasa; PAG, glutaminasa fosfato-activada; PLC, fosfolipasa C (Brann y Mahesh, 1997).

3.6.1 AAEs endógenos y su localización en el hipotálamo

3.6.1.1 AAEs endógenos

El amino ácido excitador glutamato funciona como el principal mediador de la transmisión sináptica excitatoria en el CNS (Brann, 1995). El glutamato es almacenado en las vesículas sinápticas en la terminal presináptica hasta que es liberado por despolarización en una manera dependiente del Ca^{2+} . Las concentraciones de glutamato en la hendidura sináptica pueden alcanzar niveles milimolares. Existe también evidencia de que el aspartato está localizado en vesículas sinápticas en varias partes del cerebro y puede funcionar como un neurotransmisor (van den Pol, 1991). Los aminoácidos ácidos que contienen azufre tal como el ácido L-homocisteico, el metabolito triptófano ácido quinolínico y el dipéptido N-acetil-L-aspartil-L-ácido glutámico, también han sido identificados en el cerebro, y existe evidencia soportando una función para ellos como neurotransmisores excitadores (Price *et al.*, 1978). Sin embargo, las evidencias disponibles sugieren que el glutamato es el principal AAE endógeno en el CNS que media la neurotransmisión sináptica excitatoria a través de receptores EAA.

El glutamato existe en cuatro diferentes grupos en el CNS: un grupo transmisor, un grupo metabólico, un grupo glial y un grupo precursor del ácido gamma amino butírico (GABA). Avances bioquímicos e inmunocitoquímicos han demostrado que las concentraciones de glutamato en la vesícula sináptica (grupo transmisor) son muy

altas, alcanzando aproximadamente 100 mM (Figura 9). La concentración glial promedio de glutamato, por otro lado, es mucho menor (4–5 mM), mientras las concentraciones de glutamato en una terminal GABAérgica se estiman ser de 9–11 mM (Brann y Mahesh, 1997).

Como se ilustra también en la figura 9, el glutamato es sintetizado por varias enzimas. La enzima mitocondrial, glutaminasa fosfato-activada (PAG), se cree ser una importante enzima biosintética de glutamato que cataliza la producción de glutamato de la glutamina y está presente tanto en neuronas y glia. El fosfato y calcio activan la PAG, mientras que el glutamato es inhibitorio. Por lo tanto, en estado de activación neuronal, la cual involucra hidrólisis de ATP e incrementos de calcio intracelular, la actividad de PAG puede suponer ser regulada positivamente en el neurón presináptico. La fuente de glutamina para producción neuronal de glutamato parece ser las células glial, dado que la enzima biosintética para glutamina (glutamina sintetasa) es encontrada sólo en células glial (Figura 9).

La glutamina sintetasa sirve para convertir glutamato transportado hacia las células glial en glutamina, la cual entonces es liberada al espacio extracelular para la absorción por los neuronas para uso como un sustrato para la PAG que lleva a cabo la producción de glutamato (Brann y Mahesh, 1997). Las enzimas aspartato aminotransferasa y glutamato dehidrogenasa han sido también implicadas en la síntesis de glutamato. La aspartato aminotransferasa cataliza la reacción reversible: $\text{aspartato} + 2\text{-oxoglutarato} \leftrightarrow \text{glutamato} + \text{oxaloacetato}$, mientras que la glutamato dehidrogenasa cataliza la reacción reversible: $\text{glutamato} + \text{NADP} \leftrightarrow 2\text{-oxoglutarato} + \text{NH}_3 + \text{NADPH} + \text{H}^+$. Las enzimas aspartato aminotransferasa y glutamato dehidrogenasa llevan a cabo reacciones reversibles, con la dirección determinada de las reacciones por la concentración de sustratos. Por lo tanto, la aspartato aminotransferasa y la glutamato dehidrogenasa puede funcionar ya sea para sintetizar o metabolizar glutamato (Aoki *et al.*, 1987).

3.6.1.2 Localización de los AAEs en el hipotálamo

Diversos investigadores han examinado la distribución del glutamato en el hipotálamo de varias especies. Estos estudios han revelado que dentro del hipotálamo de rata y mono, denso glutamato inmunoteñido es encontrado en los núcleos magnocelular y parvocelular paraventricular (PVN), núcleo ventromedial (VMN), núcleo supraóptico (SON), área lateral hipotalámica, núcleo supraquiasmático (SCN), núcleo arqueado (ARC), tallo infundibular, y eminencia media (ME) (van den Pol *et al.*, 1990; van den Pol, 1991; Goldsmith *et al.*, 1994). El más alto nivel de inmunoreactividad de glutamato fue observado en terminales axónicas presinápticas, mientras procesos astrocíticos mostraron significativamente menos inmunotinción (van den Pol, 1991). En conjunto, estos estudios de inmunolocalización demostraron que el glutamato está extensamente localizado en las terminales presinápticas a través de la vasta mayoría de los núcleos del hipotálamo, y por lo tanto, estratégicamente posicionados para controlar muchas funciones del hipotálamo (Brann y Mahesh, 1997).

El glutamato se libera de las terminales del neurón, esto a través de exocitosis, el cual es un evento dependiente de ATP y calcio. La exocitosis de glutamato es debida a que el calcio entra a través de canales de calcio. Este evento puede ser modificado por activación de receptores facilitadores e inhibidores sobre neurones presinápticos. El glutamato puede aumentar su propia liberación por activación del receptor a glutamato metabotrópico facilitador sobre neurones presinápticos, los cuales llevan a la fosforilación y activación de canales de K^+ rectificadores retrasados, incrementando la afluencia de calcio, y por lo tanto, incrementando la liberación de glutamato.

Los agentes que pueden inhibir la liberación de glutamato actuando mediante receptores presinápticos inhibitorios incluyen adenosina, agonistas GABA-B, y péptidos opioides. Una vez liberado hacia la hendidura sináptica, el glutamato

puede enlazarse a receptores específicos EAA sobre el neurón pre o postsináptico, o puede ser removido de la hendidura sináptica, ya sea mediante células glia (GLT-1 o GLAST) o proteínas transportadoras neuronales (EAAC1 o EAAT4) (Brann y Mahesh, 1997).

3.6.1.3 Tipos de receptores de AAE

Los receptores de EAA son los abundantes receptores de neurotransmisores excitadores en el sistema nervioso central. También son conocidos como “receptores de glutamato” ya que se cree que el glutamato es el principal enlace endógeno, aunque puede haber otros enlaces endógenos. Se han identificado dos principales grupos de receptores: 1) ionotrópicos y 2) metabotrópicos (Tabla 1). Los receptores ionotrópicos contienen canales integrales cation-ion específicos, mientras que los receptores metabotrópicos están acoplados a proteínas G y modulan la producción de segundos mensajeros, como el inositol fosfato y/o adenilato ciclasa (Brann y Mahesh, 1997).

Los receptores ionotrópicos pueden ser subdivididos en 1) *N*-metil-D-aspartato (NMDA), 2) kainato, y 3) ácido DL-alfa-amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA), de acuerdo a sus agonistas selectivos. La activación de receptores ionotrópicos de EAA lleva directamente a la apertura de un grupo de canales de iones que son tipificados mediante su diferente permeabilidad a iones Na^+ , K^+ , y Ca^{2+} . La estimulación de estos receptores “ionotrópicos” provoca una rápida transmisión sináptica excitatoria mediada por glutamato en el sistema nervioso central (CNS) (Brann y Mahesh, 1997).

Múltiples subunidades existen para cada clase de receptores ionotrópicos de EAA (Tabla 1), y se cree que estas subunidades se unen para formar un receptor de AEE funcional. Los canales del receptor NMDA son únicos en que ellos están regulados por Mg^{2+} y glicina. Mg^{2+} se enlaza a un sitio dentro del receptor NMDA acoplado a un

canal de iones resultando en un bloqueo del canal. Glicina por otro lado, es un potenciador alostérico del receptor NMDA. Con respecto a receptores AMPA, la subunidad GluR2 no pasa calcio a través de su canal, y tiene un efecto dominante cuando se expresa con otras subunidades GluR en que el canal resultante también es impermeable a calcio (Hollmann *et al.*, 1991; Verdoorn *et al.*, 1991). Además, cada subunidad del receptor existe en dos formas, llamadas “flip” y “flop,” las cuales se debe a una combinación alternativa, y patrones de expresión en el cerebro (Sommer *et al.*, 1990).

En contraste a los receptores ionotrópicos de EAA, los receptores metabotrópicos, por otro lado, no activan canales de iones. Por el contrario, su respuesta es caracterizada por una proteína G estimulando la liberación de Ca^{2+} de almacenes extracelulares mediada por ITPs y modulación de la actividad de la adenilato ciclasa (Nakanishi, 1992.). Por lo tanto, los receptores metabotrópicos ejercen modulación sináptica prolongada vía la modulación de sistemas de segundos mensajeros. Los receptores metabotrópicos han sido divididos en tres grupos basados sobre interacciones de agonistas y activación de segundos mensajeros (Pin y Duvoisin, 1995) (Tabla 1).

El grupo 1 esta comprendido de subunidades mGluR1 y mGluR5 debido al hecho de que ellos responden mejor al (ligand) quisqualato, y su activación lleva a una mayor hidrólisis de fosfatidilinositol. El grupo 2 comprende de las subunidades mGluR2 y mGluR3 basado en el hecho de que ellas responden mejor al enlace t-ACPD, e inhiben la formación de cAMP. Por ultimo, las subunidades mGluR4, mGluR6, mGluR7, y mGluR8 comprenden el grupo 3 basado sobre su mejor respuesta al ligando L-AP4 y su inhibición de formación de cAMP. Los derivados de la fenilglicina parecen selectivamente inhibir receptores metabotrópicos y pueden ser útiles en el estudio de efectos y acciones reguladoras de subunidades específicas de mGluR (Watkins y Collingridge, 1994).

Receptor subtypes	Subunits	Agonists	Antagonists	Present in hypothalamus	Present in pituitary
AMPA Kainate	GluR1-4 GluR5-7 KA1 and 2	AMPA, KA, QA, Glu KA, QA, Glu	Quinoxalinediones Quinoxalinediones	Yes (GluR5 and 6) Yes (GluR7) No (KA1) No (KA2) Yes (NR1) Yes (NR2A-D) No Yes	Yes (GluR5-7 and KA1) ND (KA2) Yes
NMDA	NMDA-R1 NMDA-R2A-D	NMDA, Glu, L-HCA	MK-801 D-APV, CPP	Yes (NR1) Yes (NR2A-D) No Yes	(NR1) Yes (NR2A-D) Yes
Metabotropic receptors (group 1)	mGluR1 and 5	QA, IBO, Glu	Phenylglycine analogs	Yes	ND
Metabotropic receptors (group 2)	mGluR2 and 3	Glu, t-ACPD, IBO	Phenylglycine analogs	Yes	Yes
Metabotropic receptors (group 3)	mGluR4, 6, and 7, 8	LAP4, Glu	Phenylglycine analogs	ND	ND

Tabla 1. Propiedades y características de receptores a glutamato ionotrópicos y metabotrópicos. KA, ácido kaínico; QA, ácido quisquálico; Glu, glutamato; L-HCA, ácido L-homocisteico; MK-801, (1)-5-metil-10,11-dihidro-5Hdibenzo[a,d]ciclohepteno-5,10-imina hidrógeno maleato; D-APV, 2-amino-5-ácido fosfoalélico; CPP, (6)-3-(2-carboxipiperazina-4-y1) ácido propil-1 fosfónico; IBO, ácido ibotenico; t-ACPD, *trans*-1-aminociclopentano-1,3-dicarboxilato; L-AP4, ácido L-2-amino-4-fosfobutanoico. ND, no determinado (Brann y Mahesh, 1997).

3.6.1.4 Transportadores de EAA

El Glutamato liberado dentro de la hendidura sináptica puede ser enlazado a receptores, o puede ser removido por transportadores de alta afinidad a glutamato localizados sobre neuronas y células glia. La remoción de glutamato mediante proteínas transportadoras previene toxicidad por la eliminación del exceso de glutamato y permite restaurar los almacenes del transmisor glutamato a través de su recaptura (Figura 1). Cuatro proteínas transportadoras han sido aisladas del cerebro. Dos de las proteínas transportadoras de Glutamato (GLAST y GLT-1) fueron aisladas de glías mientras una tercera (EAAC1) fue aislada de neuronas. La cuarta (EAAT4) parece también ser un transportador neuronal y es predominantemente expresado en el cerebelo. Por cada Glutamato transportado hacia la célula por un transportador, dos Na^+ son cotransportados hacia la célula mientras un K^+ y un ion OH^- es transportado fuera de la célula (Brann y Mahesh, 1997).

3.7 Neurobiología de la Pubertad

La mayoría de los neurotransmisores y neuromoduladores poseen propiedades tanto excitadoras e inhibitorias dependiendo de varios factores, tales como la composición

del neurocircuito, etapa de desarrollo y ambiente hormonal (Terasawa y Fernández, 2001).

3.7.1 Neurotransmisores y su papel en la secreción de GnRH al inicio de la pubertad

Un incremento en la liberación pulsátil de GnRH es esencial para el inicio de la pubertad. Sin embargo, el mecanismo controlando el incremento puberal en la liberación de GnRH no es claro hasta ahora. En primates el sistema neurosecretor de GnRH está ya activo durante el periodo neonatal pero subsecuentemente entra en un estado de dormancia en el periodo juvenil-puberal. Ni las hormonas esteroides gonadales ni la ausencia de entradas neuronales facilitadoras a neuronas de GnRH son responsables por los bajos niveles de GnRH liberada antes del inicio de la pubertad en primates (Terasawa, 2001).

Estudios recientes sugieren que durante el periodo prepuberal un sistema inhibitorio neuronal suprime la liberación de GnRH y que durante la subsiguiente maduración del hipotálamo esta inhibición prepuberal es removida, permitiendo el patrón de liberación pulsátil de GnRH en el adulto. De hecho, el ácido- γ -amino butírico (GABA) parece ser un neurotransmisor inhibitorio responsable de la restricción de la liberación de GnRH antes del inicio de la pubertad en hembras de monos Rhesus. Además, parece que la reducción tónica de GABA permite un incremento en la liberación de glutamato al igual que otros neurotransmisores, lo cual contribuye al incremento en la liberación puberal de GnRH (Terasawa, 2001).

3.7.2 Neurotransmisores inhibidores

En primates, la inhibición central de los neuronas de GnRH esta presente antes del inicio de la pubertad, y la remoción o disminución de la inhibición central desencadena el inicio de la pubertad. Este concepto se basa en lo siguiente: 1) la

secreción de gonadotropinas en humanos agonadales y en monos neonatalmente gonadectomizados se mantiene suprimida hasta el inicio de la pubertad, a pesar de la ausencia de los esteroides gonadales; y 2) la pubertad precoz ocurre en humanos y primates con lesiones hipotalámicas. De esta manera, la investigación para substratos neuronales responsables de la inhibición de la liberación de GnRH en el inicio del periodo prepuberal. Los primeros moduladores extensamente estudiados fueron los opioides endógenos, pero la evidencia que probablemente no eran candidatos para la supresión de GnRH antes del inicio de la pubertad, subsecuentemente el rol de GABA fue estudiado. GABA es el neurotransmisor inhibitorio dominante en él (Terasawa y Fernández, 2001).

3.7.2.1 Amino ácido inhibitorio GABA

Síntesis de GABA: En neurones presinápticos GABA es sintetizado del glutamato por descarboxilación en presencia de ácido glutámico descarboxilasa (GAD), almacenada en las vesículas y liberada por exocitosis por depolarización en presencia de Ca^{2+} extracelular. La síntesis de GABA ocurre en dos compartimentos: 1) neuroterminales GABAérgicas y 2) perikarya y dendritas. Glia no sintetiza GABA, pero juega una función en el metabolismo de GABA proveyendo precursores y capturando o degradando el exceso de GABA de la sinopsis (Rimvall y Martin, 1994).

La síntesis de GABA es controlada por la concentración de glutamato en los compartimentos celulares conteniendo GAD, aunque es poco claro cómo la concentración de glutamato está vinculada a la actividad neuronal para controlar la síntesis de GABA y mantener el grupo neurotransmisor, y cómo la disponibilidad de glutamato regula la síntesis fisiológica de GABA in vivo. Dos diferentes formas de proteínas han sido reportadas como enzima GAD para la síntesis de GABA.

Considerando su peso molecular son llamadas GAD67 y GAD65, las cuales son derivadas de dos respectivos genes (Rimvall y Martin, 1994).

Reabsorción de GABA: Concentraciones locales elevadas de aminoácidos neurotransmisores en la hendidura sináptica son activamente removidos por transportadores específicos, localizados sobre terminales presinápticas y rodeando las células glia, donde los neurotransmisores son reciclados. Los transportadores de GABA (GAT) están clasificados en la familia transportador acoplado a Na^+ y Cl^- . Cuatro transportadores GABA (GAT-1, GAT-2, GAT-3 y BGT-1) han sido descritos. GAT-1 es el transportador de GABA predominante en el cerebro de los mamíferos (Guastella *et al.*, 1990).

Tres receptores GABA, GABA_A , GABA_B , y GABA_C han sido identificados en el cerebro. El receptor GABA_A esta ligado a un canal de iones que permite que el Cl^- entre hacia la célula enlazado con el neurotransmisor GABA, mientras el receptor GABA_B esta acoplado a canales de calcio y potasio, al igual que a una vía de señalización intracelular, a través de proteínas enlazadoras de GTP. El receptor GABA_C es un poro para Cl^- , encontrado predominantemente en la retina de vertebrados. Los receptores GABA_A son modulados por agonistas alostéricos, benzodiazepinas, barbituratos, neuroesteroides (principalmente metabolitos de esteroides pregnano), y etanol, al igual que cationes polivalentes (Terasawa y Fernández, 2001).

3.7.2.2 El papel de GABA en la liberación de GnRH

El papel de GABA en el control de la liberación de GnRH parece ser tanto inhibitorio como estimulador. Es posible que GABA sea un neurotransmisor inhibitorio a través de receptores GABA_A , mientras que es un neurotransmisor estimulador a través de receptores GABA_B para la liberación pulsátil de GnRH/LH en animales hembras adultos. La liberación de GABA en el área preóptica media (MPOA) es pulsátil, y una

reducción de la liberación de GABA precede un incremento en la liberación de LH en ratas ovariectomizadas (OVX). La infusión directa de GABA dentro del área preóptica (POA) suprime la liberación de LH en ratas y ovejas. GABA es también un importante neurotransmisor inhibitorio antes del pico preovulatorio de LH, y en la acción de retroalimentación positiva de los esteroides ováricos en hembras. La liberación de GABA, al igual que los niveles de mRNA de GAD67 y GAD65 en el área preóptica medial (MPOA), disminuyen antes del inicio de un pico de LH inducido por estrógenos en ratas y ovejas hembras ovariectomizadas (OVX) (Terasawa y Fernández, 2001).

En machos, los neurones de GABA están involucrados en los efectos de retroalimentación negativa de testosterona. La tasa de secreción de GABA al igual que los niveles de mRNA de GAD67 y GAD65 en el área preóptica medial (MPOA) disminuyen después de la castración, concomitante con un incremento en la liberación de LH, mientras la administración de testosterona previene estos cambios en ratas machos adultos (Terasawa y Fernández, 2001).

El conflictivo papel estimulador e inhibitorio de GABA en la liberación de GnRH puede ser, en parte, explicado mediante las siguientes hipótesis: Primero, la acción de GABA puede diferir dependiendo del subtipo de receptor. Segundo, dado que los efectos de GABA sobre los neurones de GnRH pueden no sólo ocurrir directamente, pero también indirectamente a través de interneuronas, los resultados pueden depender de alteraciones en la población y/o sensibilidad de interneuronas. Estudios sugieren que GABA es inhibitorio en neuroterminales de GnRH, pero estimulador en perikarya de GnRH a través de neurones opioides inhibitorios. La entrada de GABA a neurones de GnRH en el hipotálamo del mono parece ocurrir a través de neurones de glutamato. (Thind y Goldsmith, 1997).

Tercero, las propiedades del receptor GABA_A pueden cambiar durante la maduración, así que el GABA es excitatorio cuando las células secretoras de GnRH

están inmaduras, mientras que GABA es inhibitorio cuando los neurones de GnRH se vuelven maduros. GABA es estimulador en neurones inmaduros, tal como en células GT-1 y células de GnRH cultivadas a partir de embrionarias de ratones (Hales *et al.*, 1994). Cuatro, la interacción con entrada glutamatérgica y/o receptores debido a cambios fisiológicos, incluyendo maduración neuronal, puede alterar la sensibilidad del receptor a GABA o la importancia relativa de la entrada inhibitoria GABAérgica a la entrada estimuladora glutamatérgica (Bourguignon *et al.*, 1997). Cinco, la composición de la subunidad del receptor GABA puede ser alterada por la presencia de hormonas esteroidales. La inyección de estrógeno en ratas ovariectomizadas (OVX) altera la composición de la subunidad del receptor GABA_A (Herbison y Fenelon, 1995).

3.7.3 Neurotransmisores estimuladores

El aminoácido excitatorio glutamato. Glutamato, ácido L-glutámico, es el principal neurotransmisor aminoácido excitatorio en el hipotálamo, y neurones de GnRH reciben innervaciones glutamatérgicas directas (van den Pol *et al.*, 1990). Glutamato es el vínculo endógeno para dos principales receptores de aminoácidos excitadores: 1) receptores ionotrópicos acoplados a canales de iones, los cuales posteriormente se dividen en subtipos de receptores NMDA, kainato, y ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico (AMPA); y 2) receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G. Todos estos receptores están presentes en el hipotálamo (Meeker *et al.*, 1994), y la activación de los tres receptores ionotrópicos es estimuladora a la secreción de GnRH/LH en animales adultos (Brann y Mahesh, 1997).

3.7.3.1 Desarrollo de cambios en la síntesis y liberación de glutamato

Síntesis de glutamato. La disponibilidad de glutamato liberable de las neuroterminales es esencial para la estimulación de la liberación de GnRH y, por lo

tanto, para el control del inicio de la pubertad. La actividad de la enzima para la síntesis de glutamato de glutamina, llamada glutaminasa, es mayor después de la pubertad (P50) que antes de la pubertad (P15), reflejando una entrada glutamatérgica incrementada a los neurones de GnRH después de la pubertad. Bourguignon *et al.*, (1995) mostraron que la aplicación de glutamina, un precursor para la síntesis de glutamato a explantes hipotalámicos de machos ratas en P15 y P50, resultó en la liberación de GnRH en una manera dependiente de la dosis, mientras que la aplicación del inhibidor de la glutaminasa, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina (DON), bloqueó la liberación de GnRH inducida por glutamina.

Liberación de Glutamato. Dado que el glutamato existe como cuatro diferentes grupos (un grupo transmisor, un grupo metabólico, un grupo glial y un grupo precursor de GABA) el papel del glutamato en la pubertad es complejo. Las concentraciones de glutamato en el hipotálamo de la rata incrementa con la edad postnatal, alcanzando un máximo después del inicio de la pubertad, y en la corteza de la rata los niveles de glutamato también continúan incrementando hasta la edad adulta. Un estudio de Carbone *et al.*, (1992) indica que las concentraciones de glutamato en el área preóptica media y el hipotálamo medio basal (POA/MBH) y la liberación de explantes de POA/MBH incrementa entre P16 y P30 en ratas hembras. En monos Rhesus la liberación de glutamato es muy baja durante el periodo prepuberal, incrementándose marcadamente durante el periodo puberal temprano, y manteniéndose alto durante el periodo medio puberal, aunque los niveles mediopuberales declinan ligeramente de la etapa puberal temprana. La elevación puberal de glutamato puede ocurrir rápidamente después de la reducción de GABA antes del inicio de la pubertad, ya que la liberación de glutamato incrementa varias horas después del inicio del tratamiento con un GAD67 antisentido en monos prepuberes, lo cual resulta en la reducción de la liberación de GABA dentro de 3 horas de iniciado el tratamiento antisentido (Terasawa *et al.*, 1999).

3.7.3.2 Papel del glutamato en la pubertad

El glutamato esta profundamente involucrado en la liberación pulsátil in vivo e in vitro a través de receptores NMDA y kainato. Los receptores NMDA estimulan la liberación pulsátil de LH y GnRH en ratas adultas y en monos, in vivo (Medhamurthy *et al.*, 1992), mientras el bloqueador del receptor NMDA, maleato (+)-5-metil-10, 11-dihidro-5Hdibenzo(α, d) ciclohepteno-5,10-imina (MK-801), suprime los pulsos de GnRH al igual que el pico de LH. El glutamato estimula la liberación de fragmentos hipotalámicos y células GT-1, así mismo las oscilaciones intracelulares de Ca^{2+} en células GT-1.

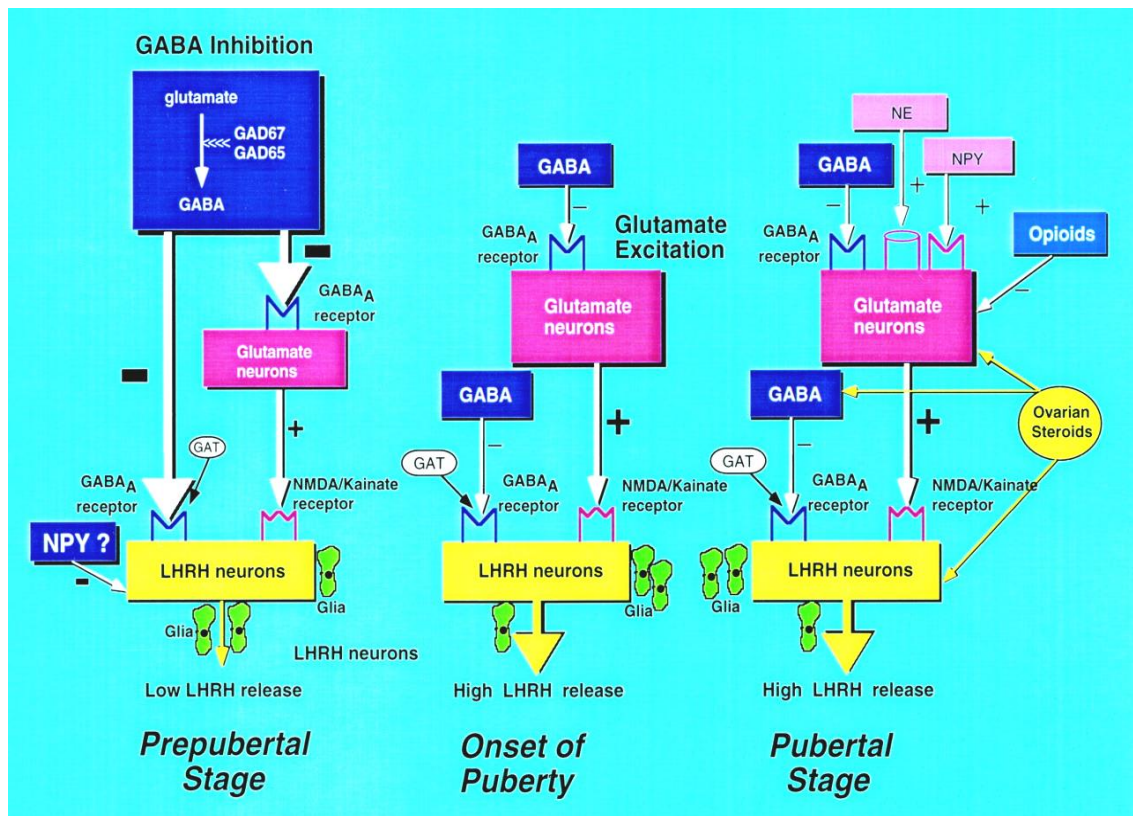


Figura 11: Comprensión actual del mecanismo del inicio de la pubertad en primates no humanos. La inhibición predominante GABAérgica sobre los neurones de GnRH a través de receptores GABA_A parece mantener baja la liberación de GnRH en monos prepúberes. Durante la etapa prepubertal, la liberación de GABA es elevada en el tronco de la eminencia media (S-ME), debido a la elevada síntesis de GABA y menos actividad del transportador GABA (GAT). La inhibición de GABA sobre los neurones de GnRH puede ser directa o indirecta a través de neurones glutamatérgicos. Al inicio de la pubertad, disminuye la liberación de GABA e incrementa la actividad de GAT en la S-ME resultando en la etapa dominante de los neurones

glutamatérgicos. Por lo tanto, la reducción en GABA y el incremento en glutamato induce el incremento puberal en la liberación de GnRH, lo cual dispara una cascada de eventos en la pubertad, por ejemplo, un incremento en la secreción de gonadotropinas, seguido por un incremento en los esteroides gonadales, los cuales resultan en la aparición de las características sexuales secundarias. Conforme la pubertad progresa, otros sistemas neurotransmisores, tal como los sistemas neuronales, sistema estimulador neuropéptido Y (NPY) y neuronas noradrenergicas (NE), los sistemas neuronales opioides inhibitorios participan en el control de la liberación de GnRH. Durante este periodo, los esteroides ováricos están también involucrados en el establecimiento del tipo de liberación pulsátil de GnRH en el adulto.

El glutamato despolariza neuronas de GnRH de la placa olfatoria del ratón, aunque neuronas embrionales de GnRH no responden a glutamato hasta que las células han estado en cultivo por 10 días (Terasawa y Fernández, 2001). Similarmente, el glutamato, NMDA y kainato estimulan la liberación de GnRH/LH en monos sexualmente inmaduros, ratas, ovejas, y ovejas fetales (Medhamurthy *et al.*, 1992) *in vitro* e *in vivo* (Medhamurthy *et al.*, 1992). Además, la estimulación de receptores NMDA resulta en la pubertad precoz en ratas y monos, mientras que la administración de bloqueadores del receptor NMDA, MK-801 o ácido 2-amino-5-fosfonovalérico (AP-5), retrasa el tiempo de la pubertad en ratas. La acción excitatoria de glutamato sobre la liberación de GnRH puede ocurrir no sólo a través de receptores NMDA, pero también a través de receptores metabotrópicos. Por tanto, el desarrollo de cambios en receptores NMDA y AMPA es parte integral del mecanismo de la pubertad (Figura 10) (Urbanski y Ojeda, 1990).

3.8 La glándula tiroides y biosíntesis de hormonas

La tiroides es la glándula endocrina maestra que juega un papel central en el metabolismo intermediario de prácticamente todos los tejidos y es de fundamental importancia para el desarrollo del sistema nervioso central (SNC) en el feto y el recién nacido. Los efectos generalizados de la tiroides resultan de la biosíntesis y

secreción de dos únicas hormonas, triyodotironina (T_3) y tiroxina o tetrayodotironina (T_4), las únicas hormonas que contienen yodo en vertebrados. Yodo (I^-) es un constituyente esencial de T_3 y T_4 de tal manera que tanto la función tiroidea en su conjunto y sus repercusiones sistémicas dependen del adecuado aporte de I^- a la glándula. Un remarcablemente eficiente y especializado sistema ha evolucionado en la tiroides que asegura que la mayoría de la ingestión dietética de I^- (la única fuente de I^-) es acumulada en la glándula y por lo tanto, disponible para la biosíntesis de T_3 y T_4 . El significado de esto se vuelve más aparente cuando se considera que el I^- es escaso en el medio ambiente (Delange, 1994).

La habilidad de las células foliculares para concentrar I^- fue reportada por primera vez en 1915. Se encontró que la glándula tiroides era capaz de concentrar yodo mediante un factor de 20-40 con respecto a su concentración en el plasma bajo condiciones fisiológicas. La acumulación de yodo en la tiroides durante mucho tiempo ha mostrado ser un proceso de transporte activo que ocurre en contra del gradiente electroquímico de I^- , estimulado por tirotropina (TSH) y bloqueado por inhibidores competitivos “clásicos” bien conocidos, los aniones tiocianato y perclorato. Eventualmente, fue determinado que el transportador tiroideo es un simportador Na^+/I^- (NIS), por ejemplo, una proteína intrínseca de transporte en la membrana plasmática que acopla la translocación negativa de Na^+ a la translocación positiva de I^- . La fuerza impulsora para el proceso es el gradiente de Na^+ dirigido al interior generado por la $Na^+-K^+-ATPasa$ (De la Vieja, 2000).

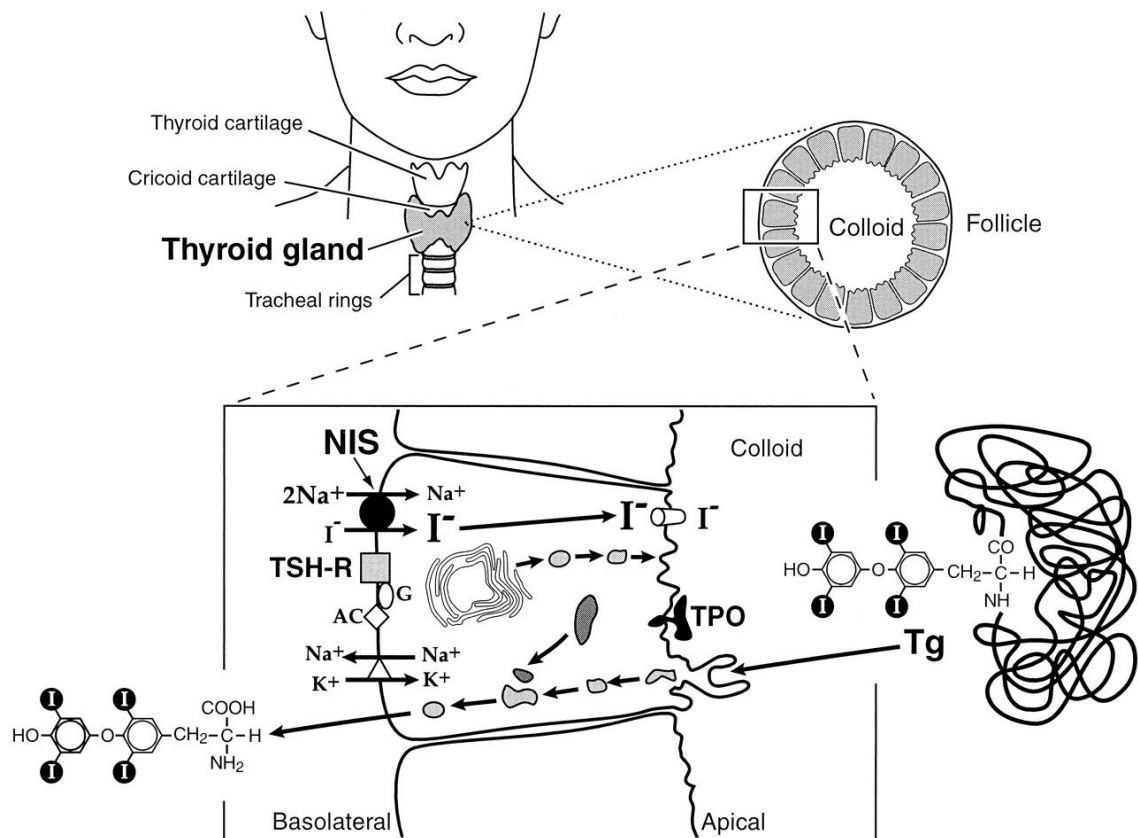


Figura 12: Representación esquemática de la ruta biosintética de hormonas de la tiroides triyodotironina (T₃) y tiroxina (T₄) en las células foliculares tiroideas. Los folículos tiroideos están comprendidos de una capa de células epiteliales rodeando el coloide. La superficie basolateral de la célula se muestra sobre la izquierda y la superficie apical sobre la derecha. Círculo, acumulación activa de I⁻, mediada por el simportador Na⁺/I⁻ (NIS); triángulo, Na⁺-K⁺-ATPasa; cuadrado, receptor de tirotropina (TSH); diamante, adenilato ciclasa; elipse, proteína G; cilindro, flujo de I⁻ hacia el coloide; TPO, peroxidasa tiroidea (TPO)-organificación catalizada de I⁻; flechas, endocitosis de tiroglobulina yodada (Tg), seguido por hidrólisis fagolisosomal de Tg yodada endocitada y secreción de ambas hormonas de la tiroides (De la Vieja, 2000).

3.8.1 La hormona estimulante de la tiroides (TSH, tiotropina)

La hormona estimulante de la tiroides y su receptor (TSHR) son proteínas claves en el control de la función de la tiroides. La síntesis de la TSH en la pituitaria anterior es estimulada por la hormona liberadora de tiotropina (TRH) e inhibida mediante

hormonas de la tiroides en un clásico circuito de retroalimentación negativa. La TSH controla la función tiroidea a partir de su interacción con proteínas G acopadas al receptor TSHR (Vassart y Dumont, 1992). La TSH enlazada a su receptor sobre células de la tiroides lleva a la estimulación de rutas de segundos mensajeros involucrando predominantemente cAMP (adenosina monofosfato cíclico) y en altas concentraciones, inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG), posteriormente resultando en la modulación de la expresión tiroidal de genes.

Las funciones fisiológicas de la TSH incluyen estimulación de funciones diferenciadas de la tiroides, tales como absorción de iodo y organificación, producción y liberación de yodotironinas de la glándula tiroides y promueve crecimiento de la tiroides. La TSH también actúa como factor protegiendo células de la tiroides de apoptosis y juega una función crítica en la ontogenia (Szkudlinski *et al.*, 2002).

3.8.2 Las hormonas de la tiroides

La glándula tiroides secreta dos yodinas conteniendo hormonas amino derivadas del aminoácido tirosina, L-tiroxina (T₄) y 3,5,3'-L-triyodotironina (T₃) (Malik y Hodgson, 2002). Las hormonas de la tiroides (THs) causan una extraordinaria multiplicidad de respuestas bioquímicas, celulares y fisiológicas de los más simples a los más complejos organismos (Tata, 2007). La síntesis y secreción de hormonas de la tiroides es exquisitamente regulada por un sistema de retroalimentación negativa que involucra el hipotálamo, pituitaria y glándula tiroides (eje hipotálamo/pituitaria/tiroides (HPT). La hormona liberadora de tirotropina (TRH) es un tripéptido (PyroGlu-His-Pro) sintetizado en el núcleo paraventricular del hipotálamo.

Ésta es transportada vía axones a la eminencia media y entonces a la pituitaria anterior vía el plexo capilar portal. TRH se enlaza a sus receptores TRH en los tirotropos de la pituitaria, una subpoblación de células de la pituitaria que secretan hormona estimulante de la tiroides (TSH). La estimulación de TRH lleva a la liberación

y síntesis de nueva TSH en los tirotropos. TSH es una glicoproteína de 28-kDa compuesto de una subunidad α - y β - designada como hormona glicoproteica subunidades α - y TSH β -. Tanto la secreción de TRH y TSH son negativamente regulados por THs. Un importante mecanismo para la regulación negativa de TSH puede ser la conversión intrapituitaria de T_4 a T_3 por el tipo deiodinasa II. Somatostatina y dopamina del hipotálamo puede regular negativamente la secreción de TSH (Yen, 2001).

La hormona estimulante de la tiroides (TSH) es el principal regulador de la liberación y secreción de THs. También tiene una función crítica en el crecimiento y desarrollo de la glándula tiroides. Un número de genes de la tiroides, incluyendo simportador Na^+/I^- (NIS), tiroglobulina (Tg), y peroxidasa tiroidea (TPO), son estimuladas por la TSH y promueven la síntesis de THs. Las THs, T_4 y la más potente T_3 , son sintetizadas in la glándula tiroides. El yodo es activamente transportado y concentrado dentro de la tiroides por NIS. El yodo atrapado es oxidado por la TPO en presencia de peroxide de hidrogeno e incorporado dentro de residuos de tirosina de una glicoproteína de 660-kDa, Tg. Esta yodación de tirosinas específicas localizada sobre Tg produce residuos monoyodados y diyodados (MIT, monoyodo-tirosinas; DIT, diyodo-tirosinas) que son acopladas enzimáticamente para formar T_4 y T_3 . La yodada Tg conteniendo MIT, DIT, T_4 y T_3 , entonces es almacenada como un polipéptido de almacén extracelular en el coloide dentro del lumen de las células foliculares de la tiroides (Yen, 2001).

La secreción de THs requiere endocitosis de Tg iodada almacenada de la superficie apical de las células foliculares de la tiroides. La Tg internalizada es incorporada en fagolisosomas y sufre digestión proteolítica, recapture de MIT y DIT, y liberación de T_4 y T_3 hacia la circulación vía la superficie basal. La mayoría de la TH liberada está en forma de T_4 , del total del suero T_4 es 40 veces mayor que el suero de T_3 (90 vs. 2 nM). Solo el 0.03% del suero total de T_4 está libre (sin enlazarse), con el resto

enlazado a proteínas transportadoras tales como globulina enlazadora de tiroxina (TBG), albúmina y prealbumina enlazadora de hormonas de la tiroides. Aproximadamente 0.3% del suero total de T_3 esta libre, con el restante enlazado a TBG y albúmina. Esta es la hormona de la tiroides libre que entra a las células blanco y genera la respuesta biológica (Yen, 2001).

La principal ruta para la producción de T_3 es vía 5'-deyodación del anillo externo de T_4 mediante deyodinasas y según para la mayoría de la T_3 circulante. Deyodinasa Tipo I es encontrada en tejidos periferales como el hígado y es responsable para la mayoría de la conversión de T_4 a T_3 en la circulación. La deyodinasa Tipo II, es encontrada en el cerebro, pituitaria y tejido adiposo café y principalmente convierte T_4 a T_3 para uso intracelular.

5'-Deyodinación por la deyodinasa tipo I y deyodinasa tipo III, las cuales se encuentran principalmente en la placenta, cerebro y piel, llevan a la generación de rT_3 (T_3 de reversa), el paso clave en la inactivación de la TH. rT_3 y T_3 ser posteriormente deyodinadas en el hígado y son sulfo- y glucoronido- conjugadas antes de la excreción en la bilis. También hay una circulación enterohepática de TH y, como la flora intestinal desconjuga algunos de estos compuestos, promueve la reabsorción de TH (Yen, 2001).

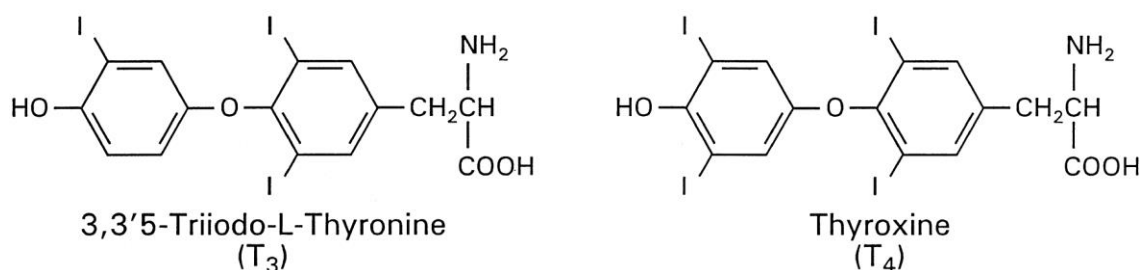


Figura 13. Estructura de las hormonas de la glándula tiroides.

3.8.3 El metabolismo de las hormonas de la tiroides

En individuos normales la glándula tiroides secreta 110 nmol de tiroxina y 10 nmol de triyodotironina cada día. Triyodotironina tiene diez veces mayor afinidad y diez veces mayor eficacia que tiroxina para el receptor nuclear, por lo tanto, aun cuando la tiroxina es cuantitativamente secretada a mucho mayor nivel, debe considerarse como una pro-hormona que requiere deiodinación y conversión a T₃ para volverse biológicamente activa. Existen 3 grupos de enzimas que regulan el metabolismo de las hormonas de la tiroides, formando parte del sistema enzimático yodotironina seleno-deyodinasas (tipo 1=D1, tipo 2=D2 y tipo 3=D3). Ellas son responsables para la activación de T₄ a T₃, la inactivación de T₄ a rT₃ (Troyodotironina reversa) y la conversión de rT₃ y T₃ a T₂ (diyodotironina) (Figura 13) (Hassi *et al.*, 2001).

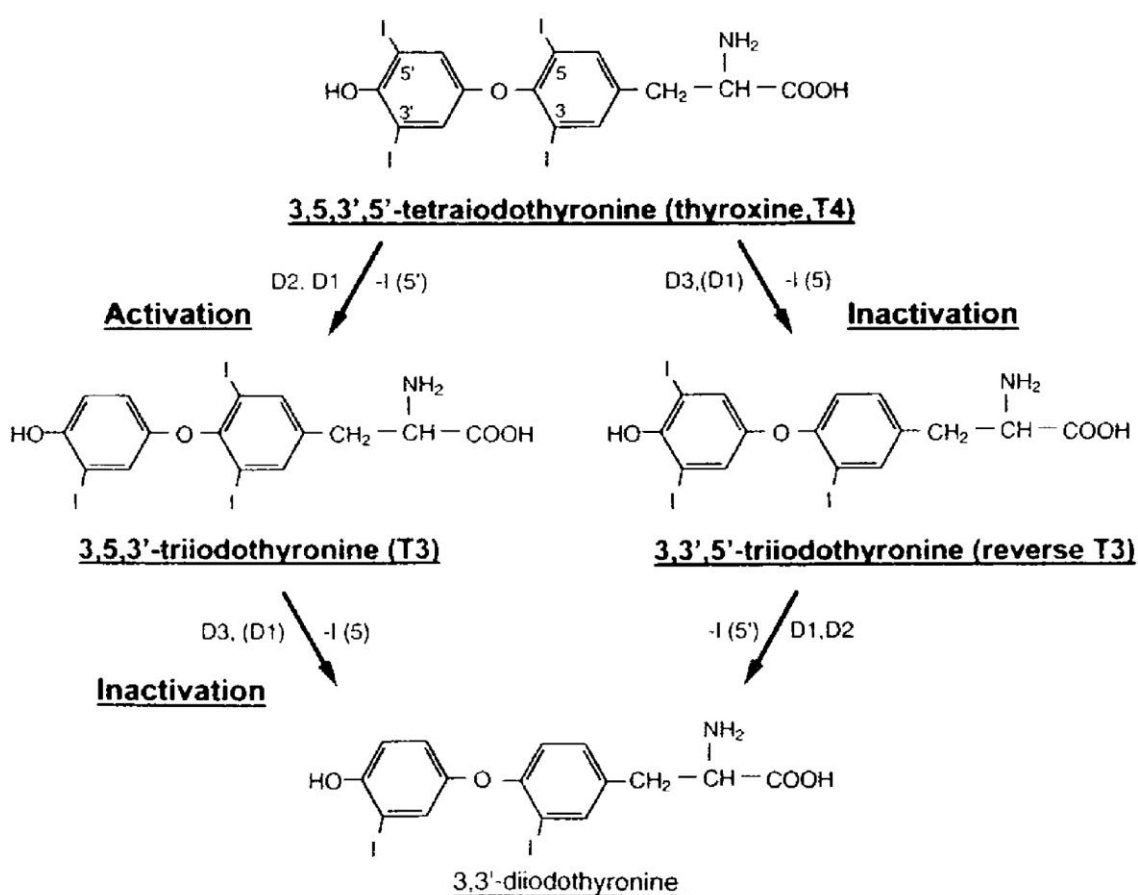


Figura 14. Estructuras e interacciones entre las principales yodotironinas.

La conversión de T_3 a T_4 en tejido extratiroidal ocurre a través de un circuito equilibrado rápidamente vía el sistema enzimático D1 y un circuito lentamente equilibrado vía el sistema D2. La deydinasa tipo 1 es principalmente encontrada en el hígado y representa aproximadamente 30-40% de la producción extratiroidal de T_3 (12 nmol). La deydinasa tipo 2 se encuentra en la pituitaria, el SNC (sistema nervioso central) y el músculo esquelético y contribuye con el 60-70% de la producción extratiroidal de T_3 (30 nmol). Aunque este sistema enzimático realiza acciones similares al grupo enzimático, su cinética, regulación y susceptibilidad al propiltiouracil son diferentes. Tanto el sistema D1 y D2 pueden también inactivar T_4 y T_3 , el principal inactivador es el sistema deydinasa tipo 3, el cual principalmente exhibe deydinación del anillo interno (a diferencia del otro). Este es encontrado en el hígado, piel y SNC, donde cataliza la conversión de T_4 a rT_3 y T_3 a T_2 , ambos metabolitos inactivos; también convierte rT_3 a rT_2 . Este sistema enzimático es también expresado en la placenta, donde protege al feto de las hormonas tiroideas maternas (Hassi *et al.*, 2001). Además del papel central en la deydinación para activar y desactivar hormonas de la tiroides, el hígado realiza funciones específicas relacionadas al transporte y metabolismo de hormonas de la tiroides.

El hígado extrae 5-100% de T_4 plasmática durante un único paso. Este valor es mucho más alto que puede ser explicado mediante la cantidad de T_4 libre depositada al hígado, indicando que una cantidad substancial de T_4 enlazada a proteína esta disponible para absorción. Un activo mecanismo de transporte estereoespecífico ha sido identificado para el transporte de T_4 y T_3 a través de la membrana de hepatocitos. Las concentraciones intracelulares de la hormona libre son mayores que los niveles plasmáticos y el proceso es dependiente de energía (Hennemann *et al.*, 2001)

El hígado sintetiza una serie de proteínas plasmáticas que enlazan las hormonas tiroideas lipofílicas y así proveen un gran, circuito rápidamente intercambiable de

hormonas. Las hormonas de la tiroides son >99% enlazadas a globulina enlazadora de tiroxina, prealbúmina enlazadora de tiroxina y albúmina en plasma. El componente hormonal libre dentro del plasma está en equilibrio con la hormona enlazada a proteína, y es esta fracción libre la que presenta las actividades biológicas de la hormona. Las concentraciones plasmáticas de T_4 y T_3 se encuentran a una concentración constante a fin de que los tejidos estén expuestos a la misma concentración de hormona libre. Sin embargo, las concentraciones de la hormona libre varían en diferentes tejidos de acuerdo al transporte y actividad de la deiodinasa dentro de tejidos específicos (Bianco *et al.*, 2002).

Por lo tanto, el estado tiroideo del tejido depende no sólo sobre la secreción de tiroxina sino también del metabolismo normal de hormonas de la tiroides, el depósito de T_3 a receptores nucleares y sobre la distribución y función del receptor. La función tiroidea normal, la cual es esencial para el crecimiento normal, desarrollo y la regulación del metabolismo energético dentro de las células, es dependiente de un funcionamiento normal del eje tiroides-hígado (Malik y Hodgson, 2001).

3.8.4 Hormonas de la tiroides a nivel génico

En el presente parece bastante claro que las hormonas de la tiroides ejercen su principal acción a nivel nuclear mediante la regulación del nivel de mRNAs de genes específicos. Existen al menos tres isoformas TR (receptor de hormonas de la tiroides) que median los efectos hormonales a nivel tejido. La caracterización de los dominios funcionales de estas isoformas del receptor está aun incompleta, y la posibilidad de que estos receptores puedan tener funciones independientes ligadas es una materia bajo actual investigación. Los TRs son ahora reconocidos como miembros de una gran superfamilia de proteínas transactivadoras involucradas en la regulación de expresión de genes. Recientes estudios han mostrado un inesperado grado de complejidad en la naturaleza de la asociación de receptores de T_3 y genes blanco.

Se tiene claramente establecidas las múltiples interacciones posibles entre el complejo receptor T_3 y otras proteínas participando en los procesos de regulación de genes (Schwartz *et al.*, 1993).

Aunque las THs pueden ejercer sus efectos sobre un número de loci intracelulares, sus principales efectos están sobre la regulación transcripcional de genes blanco. Recientes estudios muestran que los efectos de las THs a nivel geonómico son mediados por TRs, los cuales están íntimamente asociados con cromatina y enlazan TH con alta afinidad y especificidad, similar a las hormonas esteroideas que también se enlazan a receptores nucleares, TH entra a la célula y procede al núcleo (Figura 15). Entonces se enlaza a su TRs, el cual puede ser ya preenzado a elementos de respuesta a hormonas de la tiroides (TREs) localizados en regiones promotoras de genes blanco. La formación de los complejos ligando-enlace TR que está también enlazado a TREs es el primer paso crítico en la regulación positiva o negativa de genes blanco y la subsiguiente regulación de la síntesis de proteínas. Dada su habilidad para enlazar tanto ligandos y DNA así como su habilidad para regular la transcripción, TRs pueden ser considerados como ligandos regulables de factores de transcripción (Yen, 2001).

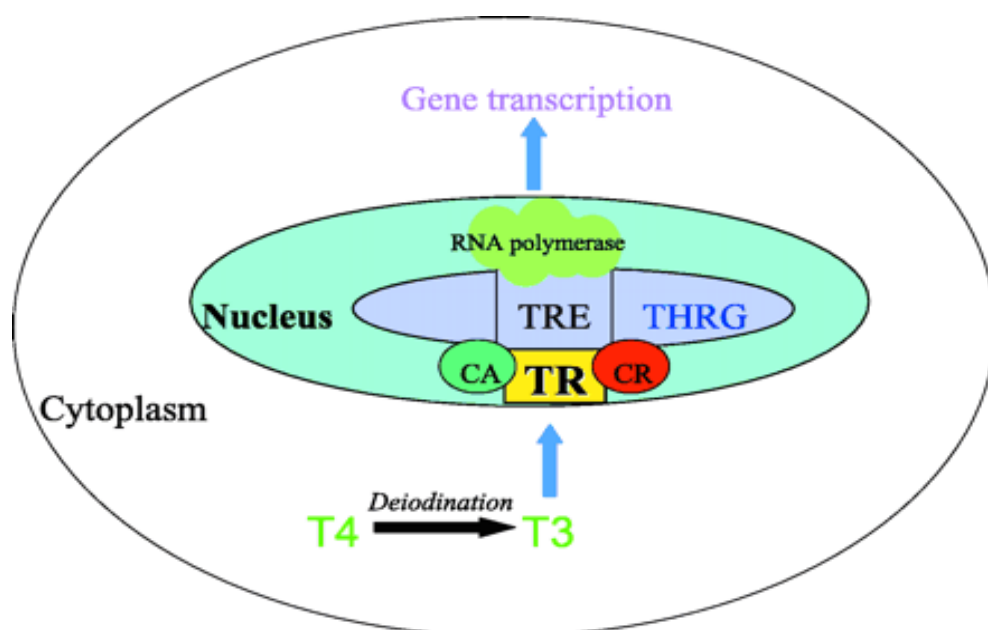


Figura 15. Activación de genes en respuesta a hormonas de la tiroides (THRG) a través de la unión de T3 a su receptor (TR) y la unión al elemento de respuesta tiroideo (TRE) localizado en la región promotora de THRG. La Activación es regulada por co-activadores (CA) y co-represores (CR), los cuales traen cambios conformacionales en la estructura del DNA, alterando la respuesta del gen a la polimerasa del RNA, la enzima responsable de la transcripción del gen.

3.8.5 Regulación de la reproducción por hormonas de la tiroides (THs)

Un cambio en el estado metabólico, definido como el cambio en la disponibilidad de nutrientes y energía a los tejidos, es un poderoso regulador de la función reproductiva en pequeños rumiantes. La naturaleza y la función de varios de los componentes de las rutas vinculando el estado metabólico a la reproducción son considerados: nutrientes y metabolitos, el sistema endocrino y el sistema nervioso (Blache, 2006).

Tiroxina y triyodotironina están involucradas en la diferenciación y crecimiento del tejido y en la regulación de numerosas funciones corporales, principalmente afectando la tasa metabólica (Karsch, 1995).

3.8.5.1 THs y la estacionalidad reproductiva

Las hormonas de la tiroides provocan una extraordinaria multiplicidad de respuestas bioquímicas, celulares y fisiológicas, desde los organismos más simples hasta los más complejos. Las diversas acciones de la hormona de la tiroides biológicamente activa, la triyodotironina (T_3), pueden ser divididos en dos grupos: crecimiento y desarrollo, y regulación del metabolismo (Tata, 2007).

Se han determinado dos principales funciones de las THs en la regulación de la estacionalidad reproductiva: Primero, la transición entre la estación de fecundación y la de anestro en ovejas es manejada por un ritmo endógeno en respuesta a la

retroalimentación negativa de estradiol. Una etapa de este ritmo, la transición al anestro, requiere la presencia de hormonas de la tiroides durante una ventana de respuesta que se abre al final de la temporada de fecundación. La segunda función de las hormonas tiroideas es para el mantenimiento y/o traslado del ritmo circanual reproductivo a fin de que la temporada de fecundación comience en el momento oportuno (Billings *et al.*, 2002). El decline en la frecuencia del pulso de LH, dependiente de esteroides que ocurre conforme los días largos incrementan es dependiente de la presencia de hormonas de la tiroides. El papel de las hormonas de la tiroides en el ritmo anual de LH dependiente de esteroides no ha sido directamente estudiado en la oveja, aunque los resultados de Moenter *et al.* (1991), sugieren una posible función de las hormonas de la tiroides en este sistema (Anderson *et al.*, 2002).

3.8.5.2 Hormonas de la tiroides en tejidos reproductivos

Diversos estudios experimentales han demostrado que las hormonas de la tiroides juegan un rol importante en la función y desarrollo testicular. Se ha establecido ahora que T₃ regula la maduración y crecimiento de los testículos, controlando la proliferación de las células de Sertoli, células de Leydig y la diferenciación durante el desarrollo testicular en ratas y otras especies de mamíferos (Mendis-Handagama y Ariyaratne, 2005). Además, cambios en los niveles de hormonas de la tiroides durante el desarrollo temprano de los testículos han demostrado afectar la maduración testicular y la reproducción posterior en la vida (Jannini *et al.*, 1995). El papel de las hormonas de la tiroides en el desarrollo y función testicular han recibido gran importancia debido a reportes que indican que receptores de hormonas de la tiroides (TRs) están presentes en altas cantidades en células de Sertoli neonatales (Buzzard *et al.*, 2000, Jannini *et al.*, 2000).

Las hormonas de la tiroides inhiben la proliferación de células de Sertoli y estimulan su maduración funcional en testículos de ratas machos prepúberes (Jannini *et al.*, 1995). La eficiencia de espermatogénesis, reflejada por la producción diaria de espermatozoides en el adulto, se correlaciona con el número total de células de Sertoli funcionales que se establecen durante el periodo prepuberal. Además, hallazgos de que receptores de hormonas de la tiroides (TRs) están presentes en testículos de humanos y ratas machos de neonatos a adultos (Buzzard *et al.*, 2000, Jannini *et al.*, 2000), lo que confirma que las hormonas de la tiroides juegan un papel clave en el desarrollo testicular. Interesantemente, la presencia de deiodinasa yodotironina, enzima que modula la concentración, y por lo tanto las acciones, de hormonas de la tiroides en diferentes tejidos, fueron también identificadas en testículos de roedores durante el periodo fetal a la vida adulta (Bates *et al.*, 1999).

Se ha vuelto muy claro que niveles adecuados de la hormona tiroidea triyodotironina (T_3) son de importancia primaria para las funciones reproductivas de la hembra. De hecho tanto en humanos y en animales, cambios en los niveles de T_3 resultan en alteraciones menstruales, disminución de la fertilidad y secreción alterada de gonadotropinas de la pituitaria (Webster *et al.*, 1991; Shi y Barrell, 1992). Además, T_3 ha demostrado modular directamente la acción de FSH y LH sobre la biosíntesis de esteroides en células de la granulosa (in vitro) de porcinos y humanos. Estos hallazgos se sustentan en la identificación de múltiples receptores T_3 RNAs mensajeros (mRNAs) y sitios de enlace de T_3 en células de la granulosa y estromales en mamíferos y en células de cúmulos y ovocitos (Cecconi *et al.*, 1991).

Se ha encontrado que la tiroxina (T_4) estimula la producción de estradiol inducida por FSH, en células de la granulosa porcina, y que además estimulaba la producción de estradiol por las células de la granulosa humana. Recientemente se ha evidenciado el papel que tienen las hormonas T_3 y T_4 en la regulación de la esteroidogénesis de folículos de bovinos. Estudios in vitro realizados en esta especie, encontraron que T_4

puede ejercer un impacto positivo leve sobre la producción de progesterona, inducida por FSH en células de la granulosa, mientras que T_3 y T_4 pueden ejercer un mayor impacto positivo sobre la producción de androstenediona en las células de la teca, lo cual podría resultar en un incremento neto de la producción de estrógenos por los folículos (Spicer *et al.*, 2001).

La concentración de yodo en el ovario es bien sabido que es mayor que en otros órganos excepto la tiroides. El consumo de yodo ovárico varía con las actividades sexuales. Recientemente se descubrió un simportador de yodo y sodio (NIS) en el ovario. La presencia de hormonas de la tiroides (TH) en el fluido folicular (FF) se ha establecido recientemente. Estudios sobre hormonas de la tiroides en fluido folicular en conejos, cerdos y caballos muestran que la concentración de T_4 es generalmente más baja que aquella en suero y que para T_3 está dentro del rango normal o más alto. Existe una correlación positiva entre los niveles de T_4 en FF y suero. Esto revela, primero, la presencia del sistema ovárico 5'-monodeyodinasas en FF capaz de generar T_3 (generada en ovario) mediante deiodación del anillo externo de T_4 . En yeguas, poliéstricas estacionales, la actividad del sistema ovárico 5'-monodeyodinasas (MD) y los niveles en fluido folicular de T_3 se han encontrado ser más altos durante el periodo ovulatorio que en el periodo no ovulatorio. Con base en estos hallazgos una función directa de T_3 para el desarrollo folicular temprano, diferenciación y para la capacidad esteroidogénica de las células de la granulosa ha sido determinada (Slebozinski, 2005). En humanos se ha encontrado la presencia de T_3 y T_4 en fluido folicular y la presencia de sitios de enlace de T_3 en células de la granulosa, lo que sugiere una función de esta hormona en la regulación de las células de la granulosa (Wakim *et al.*, 1995).

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización del área experimental

El estudio se realizó en la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo, localizada en el municipio de Tlahualilo, Durango, entre las coordenadas UTM (Universal Transversa de Mercator) 639935 E y 2864331 N, las cuales corresponden a las coordenadas geográficas 25° 53' 31.99" LN y 103° 36' 11.23" LO, a una altura de 1,117 msnm. El clima se clasifica como semidesértico extremoso (García, 1987). La temperatura media anual es de 22.3°C, de abril a octubre la temperatura media mensual es superior a 20°C, y de noviembre a marzo, con rangos mensuales entre 13.6°C y 19.4°C.; la precipitación promedio anual es de 217.1 mm (Santos, 1973). Durante junio ocurren las temperaturas más altas con más de 40°C y el mes más frío es en enero con temperatura mínima de 4°C.

4.2 Animales, su alimentación y duración del periodo experimental

Cabras prepúberes (n=18) encastadas hacia 7/8 Saanen-1/8 Criollo, con un peso aproximado de 16 kg, de 5 meses de edad fueron alimentadas dos veces al día (0700 y 1800) con heno de alfalfa (14% PC) y maíz rolo (11.2% PC) para cubrir 110% de sus requerimientos nutricionales ajustados al PV (NRC, 1985), bajo condiciones naturales de luz. El experimento fue realizado a partir del 21 de junio y finalizó el 1 de noviembre de 2007.

4.3 Diseño experimental y de tratamientos

Las cabras fueron distribuidas aleatoriamente en dos grupos con peso vivo y condición corporal homogéneos con 10 y 8 repeticiones por tratamiento (AA y CONT, respectivamente), con un diseño completamente al azar, donde la unidad

experimental fue la cabra (n=18). A cada grupo se le asignó, en forma aleatoria, uno de los tratamientos: 1). L-glutamato (AAE, n=10; 16.52 ± 1.04 kg, 3.4 ± 0.12 CC) y Control, (CONT, n=8; 16.1 ± 1.04 kg, 3.1 ± 0.12 CC). Las cabras del grupo AA recibieron una infusión endovenosa, 7 mg kg^{-1} PV de L-glutamato cada lunes y viernes durante todo el periodo del experimento. Las cabritas del grupo CONT recibieron una aplicación intravenosa de 2.5 ml de agua destilada, al mismo tiempo que les fue administrado el tratamiento al grupo AAE para homogenizar las condiciones a las que estuvieron expuestas las cabras del grupo AA.

4.4 Preparación de la solución buffer

Se pesaron 4 g de L-glutamato en polvo ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{N}_2\text{O}_3$, Merck, Alemania) en una balanza analítica para disolverse en 50 ml de agua destilada, pero debido a la dificultad observada para disolver el L-glutamato, los 4 g fueron integrados en pequeñas cantidades al agua y con la ayuda de un vortex se agitó vigorosamente hasta lograr su dilución. Posteriormente, la solución fue ajustada a un pH neutro (7.0) con HCL 0.1 N. Todo el proceso de preparación y manejo de la solución se realizó en un ambiente estéril. La solución final contenía $80 \text{ mg de L-glutamato mL}^{-1}$.

4.5 Registro de peso vivo (PV) y condición corporal (CC)

Se registró el peso de los animales una vez por mes (a partir de julio) y previo a su alimentación, acondicionándose a una báscula (Modelo G-30), una jaula que permitiera la inmovilización de las cabras. En total se tomaron 4 registros del PV. La condición corporal se midió mediante palpación dorsal y costal, utilizando una escala de cinco grados de deposición de grasa en la región lumbar, 1 (muy flaca) a 5 (muy gorda) realizándose cada mes al mismo tiempo del registro del peso vivo (Russel *et al.*, 1969), mediante los siguientes criterios:

Tabla 2. Criterios de clasificación para determinar condición corporal

Grado	Área a Palpar	Descripción
1 Muy Flaca	Apófisis Espinosas Apófisis transversas Músculos del Lomo	Apófisis espinosas puntiagudas descarnadas, bien notables a palpación, apófisis transversas agudas, los dedos perciben extremos o aletas afiladas. Músculos deprimidos, sin cobertura de grasa. Se palpa piel y huesos.
2 Flaca	Apófisis Espinosas Apófisis transversas Músculos del Lomo	Apófisis espinosa prominente pero suave. Dificultad en palpar las apófisis individuales. Apófisis transversas suaves y redondas. Músculos del lomo rectos, con poca cobertura de grasa subcutánea.
3 Normal	Apófisis Espinosas Apófisis transversas Músculos del Lomo	Las apófisis espinosas se perciben como pequeñas elevaciones suaves y redondeadas. Las apófisis transversas se tocan sólo ejerciendo presión, son suaves y están recubiertas. Los músculos del lomo están llenos, de forma convexa y moderada cobertura de grasa.
4 Gorda	Apófisis Espinosas Apófisis transversas Músculos del Lomo	Las apófisis espinosas se detectan ejerciendo presión como una línea o cordón duro entre músculos del lomo. Imposible palpar la apófisis transversas. Los músculos del lomo presentan buena cobertura de grasa.
5 Muy Gorda	Apófisis Espinosas Apófisis transversas Músculos del Lomo	Imposible palpar apófisis espinosas y transversas aunque se ejerza presión. Los músculos del lomo están muy llenos y con abundante cobertura de grasa.

4.6 Muestreo intermitente de sangre, colección y almacén de muestras

Se realizó un muestreo sanguíneo a partir del 21 de junio y hasta el 01 de noviembre (1 vez por semana). Las muestras sanguíneas fueron colectadas de cada cabra mediante venopunción de la yugular, utilizando agujas estériles de 0.8 x 38 mm (Precision Glide™ Becton y Dickson, NJ, USA) y tubos colectores estériles Vacutainer de 10 ml (Corvac, Sherwood Medical, Std. Louis, MO). Las muestras fueron llevadas al laboratorio donde se dejaron reposar por 30 minutos a temperatura ambiente hasta observarse la formación de coágulo. Las muestras fueron centrifugadas a 1500 rpm durante 15 minutos. Cada muestra de suero con su

réplica fue colectada y almacenada en microtubos de polipropileno MCT-150C (Axygen^{MR} Scientific) de 1.5 mL y almacenados a una temperatura de -20°C , en total se colectaron 20 muestras por cabra, 200 muestras para tratamiento AAE y 160 para el tratamiento CONT y un total de 360 muestras de suero.

4.7 Cuantificación de triyodotironina (T_3) y progesterona (P_4) en suero y criterios para evaluar la actividad reproductiva

Las muestras de suero fueron evaluadas por duplicado por su contenido de T_3 y P_4 , mediante radioinmunoanálisis (RIA), una técnica que puede cuantificar sustancias presentes en un organismo en concentraciones sumamente pequeñas y se puede lograr aun cuando se encuentren presentes otras sustancias casi idénticas, sin que estas interfieran en la medición, como es el caso de las hormonas de T_3 y T_4 (Schneider y Hallford, 1996); se obtuvo un coeficiente de variación (CV) intra-ensayo de 6.98% y un límite de detección de 0.2 ng mL^{-1} . El criterio para la evaluación de la actividad reproductiva es: aquellas cabritas que tuvieran dos muestras consecutivas de suero con niveles séricos de $P_4 \geq 1\text{ ng mL}^{-1}$ se clasificaban como reproductivamente activas considerando en dicho momento el inicio de la pubertad (Cushwa *et al.*, 1992). Los análisis hormonales fueron realizados en el laboratorio de endocrinología del Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Nuevo México, E.U.A.

4.8 Análisis estadísticos

Los pesos corporales (PV) y la condición corporal (CC) fueron evaluados mediante un análisis de varianza con un diseño completamente al azar con dos tratamientos de 10 y 8 unidades experimentales por tratamiento (AAE y CONT, respectivamente) (Snedector y Cochran, 1967). Las concentraciones séricas de T_3 mediante un ANOVA con un diseño completamente al azar, con un arreglo de parcelas divididas para

muestras repetidas en el tiempo (Gill y Hafs, 1971). El efecto de tratamiento fue incluido en la parcela mayor utilizando el termino de cabra dentro de tratamiento para calcular el error. El tiempo de muestreo y la interacción del tratamiento por tiempo fueron incluidos en la parcela menor, utilizando el cuadrado medio residual para probar sus diferencias. En el evento de un efecto significativo, la separación de medias consideró el procedimiento PDIFF, para probar sus diferencias mediante el procedimiento LSMEANS del procedimiento GLM (PROC GLM) del SAS (Littell *et al.*, 1991).

4.8.1 Análisis de ji-cuadrada

El porcentaje de cabritas mostrando o no actividad ovárica se comparó con un análisis de χ^2 . El análisis estadístico de los datos consideró un procedimiento estadístico para tablas de frecuencia analizados por ji-cuadrada. Se analizó la información de acuerdo a la distribución para datos categorizados, en tablas de contingencia para prueba de homogeneidad de los tratamientos.

4.9 Modelos estadísticos

Modelo (a):

$$Y_{ij} = \mu + T_i + E_{ij}$$

Y_{ij} = La variable respuesta PV y CC de la j-ésima cabra con el i-ésimo tratamiento.

μ = Media general.

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento; $i = 1, 2$ (AAE, CONT).

E_{ij} = Error experimental de la j-ésima cabra asociado al i-ésimo tratamiento ($\sim$ NID, $\mu=0$, $\sigma^2 e$).

Para evaluar el comportamiento de las concentraciones séricas de la hormona triyodotironina (T₃), se consideró el siguiente modelo:

Modelo (b):

$$Y_{ijk} = \mu + T_i + ID_{j(i)} + t_k + T_{(ik)} + E_{ijk}$$

Y_{ijk} = Concentración de T₃ (ng mL⁻¹) del i-ésimo tratamiento medida en la j-ésima cabra

μ = Media general

T_i = Efecto del i-ésimo tratamiento, donde i = 1, 2 (AAE, CONT)

ID_{j(i)} = Efecto de la j-ésima cabra en el i-ésimo tratamiento (ERROR A)

t_k = Efecto del k-ésimo tiempo de muestreo, donde k = 1,..., 20

T_{t(ij)} = Efecto de la interacción del i-ésimo tratamiento dentro del k-ésimo tiempo de muestreo

E_{ijk} = Error experimental del i-ésimo tratamiento mas la j-ésima cabra mas el k-ésimo tiempo de muestreo (~ NID, μ=0, σ² e)

Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS (Littell *et al.*, 1991). Los valores reportados son las medias de mínimos cuadrados ± el error estándar de la media.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Resultados

5.1.1 Peso vivo y condición corporal

En el cuadro 1 se muestran las medias de mínimos cuadrados para peso vivo (PV, kg) y condición corporal (CC, unidades) para los 4 registros a través del experimento, en las cuales no se observó diferencia ($P>0.50$) entre tratamientos para ambas variables.

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para el peso vivo (PV, kg), y condición corporal (CC, unidades) al final del experimento en cabras prepúberes (n= 18) bajo condiciones naturales de luz en zonas áridas.

VARIABLE	Glutamato	Testigo	P ¹	EE ²
PV (kg)	23.75 ^a	22.76 ^a	0.34	0.72
CC (1 a 5)	3.69 ^a	3.39 ^a	0.06	0.11

¹P, nivel de significancia observado

²EE, error estándar de medias de mínimos cuadrados más conservador

*Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias estadísticas significativas $P\leq 0.05$

5.1.2 Concentraciones séricas de T₃ y porcentaje de pubertad

En el cuadro 2 se muestran las medias de mínimos cuadrados de las concentraciones séricas de T₃ (ng mL⁻¹), observados a través del periodo experimental. El promedio para los niveles séricos de T₃ de dichas muestras en el presente estudio fue de 1.476 ng mL⁻¹, observándose diferencia ($P<0.001$) entre tratamientos para dicha concentración, en favor de las cabras suplementadas con glutamato.

Para la edad a la pubertad las cabras que recibieron glutamato iniciaron su actividad reproductiva a una edad más temprana ($P<0.05$) que el grupo testigo.

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados para las concentraciones de T₃ y el porcentaje de cabras puberales (n=18) bajo condiciones naturales de luz en un ambiente xérico.

VARIABLE	Glutamato	Testigo	P ¹	EE ²
T ₃	1.559 ^a	1.392 ^b	0.0096	0.04
% Pubertad	75.00 ^a	25.00 ^b	0.05	36.0

¹P, nivel de significancia observado

²EE, error estándar de medias de mínimos cuadrados más conservador

*Letras diferentes en la misma fila, indican diferencias estadísticas significativas P≤0.05

Las cabras suplementadas presentaron una pubertad más precoz (6.9 ± 0.8 vs. 7.5 ± 1.0 meses) y una mayor actividad ovárica (75% vs. 25%) respecto al grupo control.

5.1.3 Inducción de la pubertad

De acuerdo al análisis con ji-cuadrada, se efectuó una prueba de homogeneidad de tratamientos (AAE, CONT) y organizando la información en una tabla de contingencia con el número de cabras inducidas a pubertad precoz, y el tratamiento, tomando como no entrada a pubertad a 0 (< 1 ng mL⁻¹ de P4) y entrada a pubertad 1 (> de 1 ng mL⁻¹ de P4); para probar la hipótesis de que el tratamiento AAE tiene un efecto significativo (P<0.05), con respecto al tratamiento control (CONT), en el inicio de la pubertad a una edad más temprana.

Cuadro 3. Análisis de χ^2 para el número de cabras que entraron a pubertad a una edad más temprana.

TRATAMIENTO	0	1	Σ
Glutamato	3	7	10
Testigo	6	2	8
Σ	9	9	18

Existió diferencia ($P < 0.0691$) entre tratamientos para inducción a la pubertad, por lo que se acepta la hipótesis de que la administración de glutamato, a cabras prepuberales adelanta la edad a la pubertad.

5.2 Discusión

Los resultados del presente estudio establecen un papel importante del glutamato en la interpretación de la información ambiental y la subsecuente regulación del eje neuroendocrino reproductivo al demostrar que la suplementación de glutamato promovió la pubertad de las cabras a una edad más temprana, así como diferencias entre grupos con respecto a los niveles de T_3 a favor del grupo que recibió glutamato; además quedó demostrado que la investigación de glutamato puede proveer una herramienta para el entendimiento de cómo T_3 afecta el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, independiente del ambiente.

Diferentes autores (van den Pol *et al.*, 1990; Cicero *et al.*, 1988) han determinado que el glutamato es el neurotransmisor excitatorio más dominante en el hipotálamo, y que tiene un rol significativo en el pico preovulatorio de GnRH. Bourguignon *et al.*, (1989), Donoso *et al.*, (1990), Gore *et al.*, (1994), determinaron que la activación de los receptores NMDA estimulan la liberación de GnRH en animales prepúberes y púberes, teniendo como resultado la pubertad precoz en primates y ratas (Gore *et al.*, 1996), mientras que la administración de bloqueadores de los NMDA retrasa el

tiempo de la pubertad en ratas (Urbanski *et al.*, 1990). Claypoo *et al.* (2000), demostraron en experimentos que una sola inyección intravenosa de NMDA, un aminoácido excitatorio análogo, incrementó la liberación de GnRH en monos hembras en la etapas previas, al principio y media puberal del desarrollo y la respuesta a NMDA tendió a ser mayor en monos en pubertad media que en monos prepúberes.

Parent (2005), establece que el glutamato tiene un marcado efecto estimulador sobre el eje reproductivo, particularmente en la pubertad, la cual se caracteriza por una mayor sensibilidad de GnRH a glutamato, así como un incremento en la actividad de la glutaminasa en el hipotálamo, por lo que la regulación glutamatérgica y GABAérgica de la secreción de GnRH parece fuertemente interdependiente alrededor de la pubertad.

Blache *et al.* (2006) menciona que las hormonas tiroideas tienen un rol en el control de la reproducción estacional en ovejas. Sin embargo, existe muy poca evidencia que sugiera que las hormonas tiroideas son parte de la ruta de señalización relacionada al balance energético y la reproducción. Anderson *et al.* (2002) encontraron que las hormonas de la tiroides están relacionadas con la declinación dependiente de esteroides de la frecuencia del pulso de LH que ocurre conforme los días largos se incrementan y que la tiroidectomía en el tiempo de máxima frecuencia impide esta declinación.

Moenter *et al.* (1991) sugieren un posible rol de las hormonas de la tiroides en el ritmo anual de LH dependiente de esteroides, aunque esto no ha sido directamente estudiado en la oveja. Según Ojeda *et al.*, (2006) la existencia de genes funcionalmente conectados controlando el proceso puberal es consistente con el concepto de que la pubertad está bajo control genético y que las bases genéticas, tanto de la normal y alterada pubertad, son poligénicas en lugar de específicas por un solo gen.

Estudios realizados por Schwartz *et al.* (1993) han demostrado un inesperado grado de complejidad en la naturaleza de la asociación de los receptores de T_3 y el ADN de genes blanco. Señalando claramente múltiples interacciones posibles entre el complejo receptor- T_3 y otras proteínas que participan en el proceso de regulación de genes. Estas percepciones han proporcionado una base sólida para comprender las diferencias en el nivel de efecto de las hormonas tiroideas en un tejido a otro, y aunque la organización de esta red de genes aún no está definida, su existencia concuerda con la noción de que el comienzo de la pubertad es un proceso determinado mediante la contribución de varios genes (Krewson *et al.*, 2004); por lo que en su activación probablemente estén influyendo las hormonas de la tiroides, específicamente, T_3 .

Arufe *et al.* (2002), demostraron que las concentraciones séricas de hormonas de la tiroides y los niveles de la hormona estimulante de la tiroides están reguladas mediante la neurotransmisión de aminoácidos excitadores (AAE), ya que la administración de receptores antagonistas a glutamato como 6-ciano-7-nitroquinoxalino-2,3-dion (CNQX) y dizocilpin (MK-801) produjo una disminución en los niveles de séricos de TSH y hormonas de la tiroides; y la administración de agonistas como lo son el ácido kaínico y ácido domóico incrementaron las concentraciones de TSH, mientras que CNQX bloqueó completamente la liberación de TSH inducida por ácido kaínico y ácido domóico. Estableciendo una importante función de los EAA endógenos en la regulación de la secreción de hormonas del eje pituitaria-tiroides.

Slebozinski (2005) determinó una función directa de T_3 en el desarrollo folicular temprano, diferenciación y capacidad esteroidogénica de las células de la granulosa, funciones que son determinantes en el proceso de ovulación y por consecuencia en el inicio de la pubertad; esto debido a la presencia de hormonas de la tiroides (TH) en el fluido folicular (FF) y la presencia del sistema ovárico 5'-

monodeyodinasas en FF capaz de generar T_3 (generada en ovario) mediante deiodación del anillo externo de T_4 . Encontrándose que en yeguas, la actividad del sistema ovárico 5'-monodeyodinasas (MD) y los niveles en fluido folicular de T_3 son más altos durante el periodo ovulatorio que en el periodo no ovulatorio.

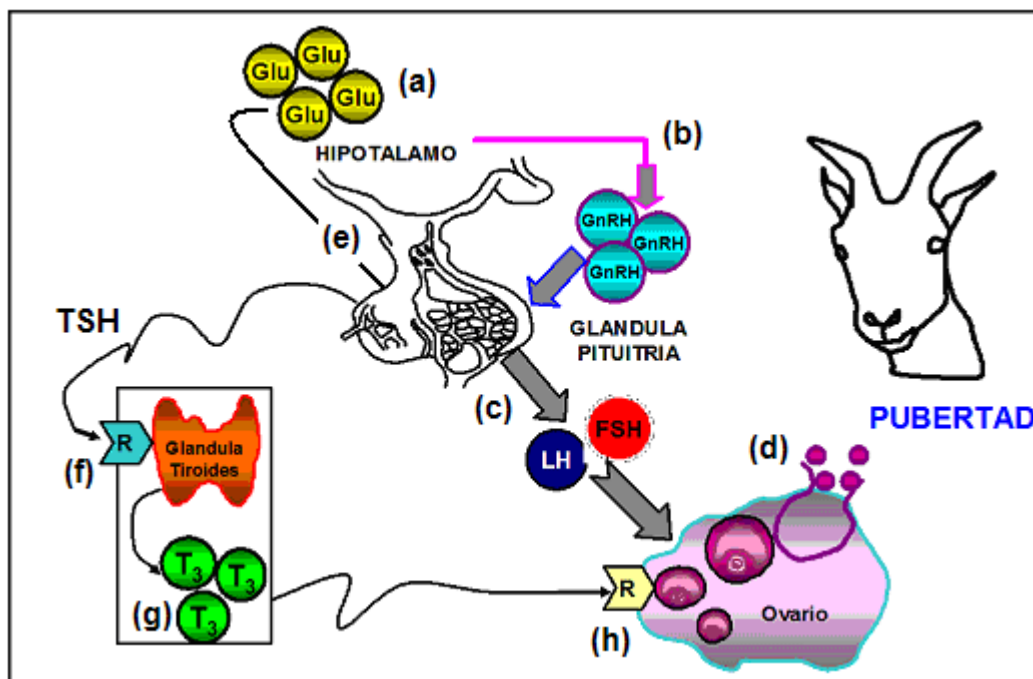
Reddy *et al.*, (1990) demostró que la tiroidectomía o supresión de la función de la glándula tiroides en cabras hembras perjudicaba o abolía la función ovárica normal, lo que se explica por la posibilidad de que problemas en la función de la tiroides puede afectar las respuestas de retroalimentación de esteroides requeridas para la generación del pico preovulatorio de la hormona luteinizante (LH) (Webster *et al.*, 1991; Anderson and Barrell, 1998).

A través de estudios en fisiología ambiental, Nixon *et al.* (1988) mostraron que el verano calido causa una reducción de la actividad de la glándula tiroides, resultando en una baja concentración plasmática de las hormonas de la tiroides, lo que puede deberse al efecto del calor sobre el eje hipotálamo-pituitaria causando la reducción de la hormona liberadora de tirotrópina para que el animal reduzca su metabolismo basal (Khaled, 2004). Tal declinación en la función de la tiroides puede algunas veces reducir la fertilidad en los animales.

En resumen, parece probable que el tono inhibitorio de la liberación de GnRH en la etapa prepuber sea suprimido por la acción estimuladora del glutamato a nivel neuronal, promoviendo una activación precoz en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, desencadenando la liberación de GnRH con la subsiguiente secreción de gonadotropinas (LH, FSH) y su acción en el ovario promoviendo el inicio de la actividad reproductiva en las cabras. Por otro lado, el glutamato a través de su acción neurotransmisora tiene una función reguladora de la secreción de la hormona tirotrópina (TSH) y las hormonas de la glándula tiroides (T_4 , T_3), las cuales han demostrado tener un efecto directo en la funcionalidad del ovario, particularmente

en el proceso de ovulación promoviendo un mejor ambiente endocrino y estimulando la secreción de esteroides ováricos.

Debido a que en condiciones de temperaturas ambientales altas se suprime la liberación de TSH, T_4 y T_3 , lo que trae consigo una baja en la fertilidad, el glutamato puede jugar un rol directo al promover un ambiente neural adecuado, suprimiendo el efecto ambiental, permitiendo e incrementando la secreción de hormonas de la tiroides, específicamente T_3 para que ésta actúe como un modulador metabólico de acción directa en el ovario y un elemento sinérgico involucrado en el proceso que desencadena el inicio de la pubertad. Esto demuestra que el glutamato promueve cambios neuronales en los sistemas endocrinos y metabólicos a través de la etapa prepuber que posibilitan el inicio de la pubertad en ambientes extremos.



Posible mecanismo de acción por el cual el glutamato a través de dos rutas (a-d) y (e-h) puede estimular el inicio temprano de la pubertad en cabras. (a) La estimulación de glutamato en el hipotálamo a través de la activación de sus receptores en los neurones de GnRH, promueve la liberación de la hormona liberadora de

gonadotropinas (b) (GnRH) la cual estimula la glándula pituitaria y (c) la subsiguiente secreción de gonadotropinas (LH y FSH) que tienen su acción en el ovario promoviendo el inicio de la actividad reproductiva =Pubertad; por otro lado, el glutamato a través de su acción neurotransmisora (e) estimula la liberación de tirotropina (TSH), la cual a través de su enlace a receptores en la glándula tiroides (f) activa la liberación de hormonas de la tiroides (g) (específicamente T₃) que del mismo modo a través de sus receptores a nivel folicular (h) llevara acabo sus efectos para promover un ambiente endocrino y estructural adecuado en el ovario, como factor sinérgico para el inicio temprano de la actividad reproductiva =Pubertad.

El papel del ambiente animal en el esquema de producción será más importante en el futuro, por lo que el impacto de las distintas variables ambientales en la producción animal deberá ser bien identificado y en cierta medida deberá predecirse con exactitud el nivel de rendimiento de los animales expuestos a diferentes combinaciones de estimulación ambiental, ya que el futuro de la producción animal dependerá en gran medida de la capacidad para integrar todos los factores de manejo y el medio ambiente animal con un enfoque de sistemas para la producción animal. Por lo tanto el futuro incluirá animales que genéticamente sean tolerantes a los efectos de los factores de estrés medioambientales.

VI. CONCLUSIONES

- La aplicación endovenosa de 7 mg kg^{-1} dos veces por semana de glutamato en cabras prepuberales, promovió el inicio más temprano de la pubertad, posiblemente a través de la señalización de una ruta no dependiente de gonadotropinas.
- La administración de glutamato promovió un incremento en los niveles de triyodotironina (T_3), los cuales probablemente influyeron de manera positiva con el proceso del comienzo de la pubertad, a nivel fisiológico, específicamente en el ovario, debido a la presencia de receptores a T_3 , promoviendo posiblemente un mejor ambiente para el desarrollo folicular y la mayor producción de estrógenos.
- La aplicación de glutamato permite adelantar la pubertad de las cabras, e inducirlas a concebir en periodos precisos del año, fuera de la estación reproductiva y en periodos climáticos críticos del año, para lograr el éxito reproductivo y productivo de cabras en zonas áridas.

VII. LITERATURA CITADA

1. **Ames DR and Ray DE, 1983.** Environmental Manipulation to Improve Animal Productivity. *J Anim Sci* 57: 209-220.
2. **Anderson .M and Barell G K, 199).** Effects of thyroidectomy and thyroxine replacement on seasonal reproduction in the red deer hind. *J Reprod Fert* 113: 239-250.
3. **Anderson GM, Connors JM, Hardy SL, Valent M, and Robert L, 2002.** Goodman Thyroid Hormones Mediate Steroid-Independent Seasonal Changes in Luteinizing Hormone Pulsatility in the Ewe. *Biol Reprod* 66: 701-706.
4. **Aoki C, Milner TA, Berger SB, Sheu K., Blass JP and Pickel VM, 1987.** Regional distribution of astrocytes with intense immunoreactivity for glutamate dehydrogenase in rat brain: implications for neuroglial interactions in glutamate neurotransmission. *J Neurosci* 7: 2214–2231.
5. **Arufe M C, Durán R, Perez-Vences D, Alfonso M, 2002.** Endogenous excitatory amino acid neurotransmission regulates thyroid-stimulating hormone and thyroid hormone secretion in conscious freely moving male rats. *Endocrine*. 17(3):193-7.
6. **Badinga L, Thatcher WW, Diaz T, Drost M and Wolfenson D., 1993.** Effect of environmental heat stress on follicular development and steroidogenesis in lactating Holstein cows. *Theriogenology* 39 797–810.
7. **Barb CR, Kraeling RR, 2004.** Role of leptin in the regulation of gonadotropin secretion in farm animals. *Anim. Reprod. Sci.* 82–83, 155–167.
8. **Ben Salem I, Rekik M, Ben Hamouda M, Lassoued N, Blache D, 2008.** Live weight and metabolic changes and the associated reproductive performance in maiden ewes. *Small Ruminant Research*.
9. **Bianco AC, Salvatore D, Gereben B, Berry MJ, Larsen PR, 2002.** Biochemistry, cellular and molecular biology, and physiological roles of the iodothyronine selenodeiodinases. *Endocr Rev*; 23:38–89.
10. **Billings HJ, Viguié C, Karsch FJ, Goodman RL, Connors JM and Anderson GM, 2002.** Temporal Requirements of Thyroid Hormones for Seasonal Changes in LH Secretion. *Endocrinology* 143: 2618-2625.
11. **Blache D, Zhang S, Martin GB, 2006.** Dynamic and integrative aspects of the regulation of reproduction by metabolic status in male sheep. *Reprod. Nutr. Dev.* 46: 379–390.
12. **Boelaert K and Franklyn JA, 2005.** Thyroid hormone in health and disease. *Journal of Endocrinology* 187: 1-15.
13. **Bourguignon J-P, Gerard A, Franchimont P, 1989.** Direct activation of gonadotropin-releasing hormone secretion through different receptors to neuroexcitatory amino acids. *Neuroendocrinology* 49: 402–408.

- 14. Bourguignon J-P, Gérard A, Gonzalez M-LA, Purnelle G, Franchimont P, 1995.** Endogenous glutamate involvement in pulsatile secretion of gonadotropin-releasing hormone: evidence from the effect of glutamine and developmental changes. *Endocrinology* 136: 911–916.
- 15. Bourguignon J-P, Gérard A, Purnelle G, Czajkowski V, Yamanaka C, Lemaître M, Rigo J-M, Moonen G and Franchimont P, 1997.** Duality of glutamatergic and GABAergic control of pulsatile GnRH secretion by rat hypothalamic explants. II. Reduced NR2C- and GABA_A-receptor-mediated inhibition at initiation of sexual maturation. *J Neuroendocrinol* 9:193–199.
- 16. Boyazoglu, J, Hatziminaoglou I and Morand-Fehr P, 2005.** The role of goat in society: Past, present and perspectives for the future. *Small Rumin. Res.* 60: 13-23.
- 17. Brann DW, and Mahesh Virendra B, 1997.** Excitatory Amino Acids: Evidence for a Role in the Control of Reproduction and Anterior Pituitary Hormone Secretion. *Endocrine Rev* 18: 678–700.
- 18. Brann DW, 1995.** Glutamate: a major excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Neuroendocrinology* 61:213–225.
- 19. Bronson, FH, 1989.** Mammalian reproductive biology. Chicago, IL: University of Chicago Press.
- 20. Buzzard JJ, Morrison JR, O'Bryan MK, Song Q and Wreford NG, 2000.** Developmental expression of thyroid hormone receptors in the rat testis. *Biol Reprod* 62: 664-669.
- 21. Carbone S, Szwarcfarb B, Otera-Losada M and Moguilevsky JA, 1992.** Effects of ovarian steroids on the gonadotropin response to *N*-methyl-D-aspartate and on hypothalamic excitatory amino acid levels during sexual maturation in female rats. *Endocrinology* 130:1365–1370.
- 22. Castellano JM, Navarro VM, Fernandez-Fernandez R, Nogueiras R, Tovar S, Roa J, Vazquez MJ, Vigo E, Casanueva FF, Aguilar E, Pinilla L, Dieguez C and Tena-Sempere M, 2005.** Changes in hypothalamic KiSS-1 system and restoration of pubertal activation of the reproductive axis by kisspeptin in undernutrition. *Endocrinology* 146:3917–3925.
- 23. Cecconi S, Rucci N., Scaldaferri ML, Masciulli MP, Rossi G, Moretti C, D'Armiento M. and Ulisse S, 1991.** Thyroid Hormone Effects on Mouse Oocyte Maturation and Granulosa Cell Aromatase Activity. *Endocrinology* 140:4 1783-1788.
- 24. Cicero TJ, Meyer ER and Bell RD, 1988.** Characterization and possible opioid modulation of *N*-methyl-D,L-aspartic acid induced increases in serum luteinizing hormone levels in the developing male rat. *Life Sci* 42:1725–1732.
- 25. Claypool LE, Kasuya E, Saitoh Y, Marzban F and Terasawa E, 2000.** *N*-methyl D,L-aspartate induces the release of luteinizing hormone-releasing hormone in the prepubertal and pubertal female rhesus monkey as measured by *in vivo* push-pull perfusion in the stalk-median eminence. *Endocrinology* 141:219–228.

- 26. Devendra, C, 2001.** Small ruminants: imperatives for productivity enhancement improved likelihood and rural growth-A review. *Asian-Austr. J. Anim. Sci.* 14: 1483-1496.
- 27. Donoso AO, Lopez FJ and Negro-Vilar A, 1990.** Glutamate receptors of the non-*N*-methyl-D-aspartic acid type mediate the increase in luteinizing hormone-releasing hormone release by excitatory amino acids *in vitro*. *Endocrinology* 126:414–420.
- 28. Dungan HM, Clifton DK and Steiner RA, 2006.** Kisspeptin neurons as central processors in the regulation of GnRH secretion. *Endocrinology* 147,1166–1174.
- 29. Dungan HM, Clifton DK and Steiner RA, 2005.** Minireview: Kisspeptin Neurons as Central Processors in the Regulation of Gonadotropin-Releasing Hormone Secretion. *Endocrinology* 147: 1154-1158.
- 30. Ebling Francis J P, 2005.** The neuroendocrine timing of puberty. *Reproduction*, 129 675-683.
- 31. Finocchiaro R, van Kaam JBC HM, Portolano B, and Misztal I, 2005.** Effect of Heat Stress on Production of Mediterranean Dairy Sheep. *J. Dairy Sci.* 88:1855-1864.
- 32. Garcia, E, 1987.** Modificaciones al sistema de clasificacion de Koopen: para adaptarlo a las condiciones de la Republica Mexicana. Instituto de Geografia, UNAM, Mexico, 217pp.
- 33. Gill, JL, and Hafs HD, 1971.** Analysis of repeated measurements of animals *J. Anim. Sci.* 33:331-336.
- 34. Genevieve S, Neal-Perry, Gail D, Zeevalk, Nanette F. Santoro and Anne ME, 2005.** Attenuation of Preoptic Area Glutamate Release Correlates with Reduced Luteinizing Hormone Secretion in Middle-Aged Female Rats. *Endocrinology* 146: 4331-4339.
- 35. Goldsmith PC, Thind K, Perera A, Plant T, 1994.** Glutamate-immunoreactive neurons and their gonadotropin-releasing hormone neuronal interactions in the monkey hypothalamus. *Endocrinology* 134: 858–868.
- 36. Gore AC, Wu TJ, Rosenberg JJ, Roberts JL, 1996.** Gonadotropin-releasing hormone and NMDA receptor gene expression and colocalization change during puberty in female rats. *J Neurosci.* 16: 5281–5289.
- 37. Gore AC and Roberts JL, 1994.** Post-transcriptional regulation of gonadotropin releasing hormone gene expression by the excitatory amino acids kainic acid and *N*-methyl-D,L-aspartate in the male rat. *Endocrinology* 134: 2026–2031.
- 38. Guastella J, Nelson N, Nelson H, Czyzyk L, Keynan S, Miedel MC, Davidson N, Lester HA and Kanner BI, 1990.** Cloning and expression of a rat brain GABA transporter. *Science* 249: 1303–1306.

- 39. Greives JT, Mason OA, Scotti LMA, Levine J, Ketterson DE, Kriegsfeld JL, and Demas E.G, 2006.** Environmental Control of Kisspeptin: Implications for Seasonal Reproduction. *Endocrinology*, 148:1158-1166.
- 40. Greives J.T, Kriegsfeld J.L, Bentley E.G, Tsutsui K and Demas E.G, 2008.** Recent advances in reproductive neuroendocrinology: a role for RFamide peptides in seasonal reproduction?. *Proc. R. Soc. B.*, 275, 1943–1951.
- 41. Hales TG, Sanderson MJ and Charles AC, 1994.** GABA has excitatory actions on GnRH-secreting immortalized hypothalamic (GT1–7) neurons. *Neuroendocrinology* 59: 297–308.
- 42. Hassi J, Sikkila K, Ruukonen A, Leppaluoto J., 2001.** The pituitary-thyroid axis in healthy men living under subarctic climatological conditions. *J Endocrinol*; 169:195–203.
- 43. Hayes B J, Carrick M, Bowman P, and Goddard ME, 2003.** Genotype x environment interaction for milk production of daughters of Australian dairy sires from test-day records. *J. Dairy Sci.* 86:3736–3744.
- 44. Hennemann G, Docter R, Friesema EC, de Jong M, Krenning EP and Visser TJ, 2001.** Plasma membrane transport of thyroid hormones and its role in thyroid hormone metabolism and bioavailability. *Endocr Rev* 22: 451–76.
- 45. Herbison AE and Fenelon VS, 1995.** Estrogen regulation of GABA_A-receptor subunit mRNA expression in preoptic area and bed nucleus of the stria terminalis of female rat brain. *J Neurosci* 15: 2328–2337.
- 46. Herbison Allan E., Porteous Robert, Pape Jean-Rémi, Mora Jocelyn M. and Hurst Peter R., 2007.** Gonadotropin-Releasing Hormone Neuron Requirements for Puberty, Ovulation, and Fertility. *Endocrinology* 2: 597-604.
- 47. Hollmann M, Hartley M and Heinemann S., 1991.** Ca⁺² permeability of KA-AMPA gated glutamate receptor channels depends on subunit composition. *Science* 252:851–853.
- 48. Iovane A, Aumas C and de Roux N., 2004.** New insights in the genetics of isolated hypogonadotropic hypogonadism. *Eur J Endocrinol*; 151 (Suppl. 3): U83–U88.
- 49. Jannini EA, Ulisse S and D'Armiento M., 1995.** Thyroid hormone and male gonadal function. *Endocrine Reviews* 16 443-459.
- 50. Jannini EA, Crescenzi A, Rucci N, Screponi E, Carosa E, de Matteis A, Macchia E, d'Amati G and D'Armiento M, 2000.** Ontogenetic pattern of thyroid hormone receptor expression in the human testis. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 85 3453-3457.
- 51. Jennes L, Lin W and piLakhiani S, 2002.** Glutamatergic regulation of gonadotropin-releasing hormone neurons. *Prog Brain Res.* 141:183–192.
- 52. Karsch FJ, Dahl GE, Hachigian TM and Thrun LA., 1995.** Involvement of thyroid hormones in seasonal reproduction. *J Reprod Fertil Suppl. J Reprod Fertil Suppl*, 49: 409–422.

- 53. Kassem R, Owen JB, Fadel I, 1989.** The effect of pre-mating nutrition and exposure to the presence of rams on the onset of puberty in Awassi ewe lambs under semi-arid conditions. *Anim. Prod.* 48, 393–397.
- 54. Khaled A and AL-Busadah, 2004.** The Effect of Induced Hypothyroidism on Fertility of Goats During Summer Season. *Scientific Journal of King Faisal University (Basic and Applied Sciences)* 5: 1425.
- 55. Krewson TD, Supelak PJ, Hill AE, Singer JB, Lander ES, Nadeau JH, and Palmert MR, 2004.** Chromosomes 6 and 13 Harbor Genes that Regulate Pubertal Timing in Mouse Chromosome Substitution Strains. *Endocrinology*; 145: 4447 - 4451.
- 56. Lebbie, S.H.B., 2004.** Goats under household conditions. *Small Rumin. Res.* 51, 131-136.
- 57. Lee JH, Miele ME, Hicks DJ, Phillips KK, Trent JM, Weissman BE and Welch DR, 1996.** KiSS-1, a novel human malignant melanoma metastasis-suppressor gene. *J Natl Cancer Inst* 88:1731–1737.
- 58. Lewis G. S., Thatcher W. W., Bliss E. L., Drost M., and Collier R. J., 1984.** Effects of Heat Stress during Pregnancy on Postpartum Reproductive Changes in Holstein Cows. *J Anim Sci*; 58: 174 - 186.
- 59. Littell, C.R., Freund, J.R. and Philip, C. 1991.** Sas® system for linear models, third edition, Cary, NC, SAS Institute Inc., 329 pp.
- 60. Malik R and Hodgson H, 2002.** The relationship between the thyroid gland and the liver. *Q J Med* 95: 559-569.
- 61. Martin GB, Tjondronegoro S, Boukhliq R, Blackberry MA, Briegel JR, Blache D, Fisher JA, Adams NR, 1999.** Determinants of the annual pattern of reproduction in mature male Merino and Suffolk sheep: modification of endogenous rhythms by photoperiod. *Reprod. Fertil. Dev.* 11 (6), 355–366.
- 62. Maruo T, Hayashi M, Matsuo H, Yamamoto T, Okada H., 1987.** The role of thyroid hormones as a biological amplifier of the actions of follicle-stimulating hormone in functional differentiation of cultured porcine granulosa cells. *Endocrinology* 121: 1233-1241.
- 63. Medhamurthy R, Gay VL and Plant TM, 1992.** Repetitive injections of L-glutamic acid, in contrast to those of N-methyl-D,L-aspartic acid, fail to elicit sustained hypothalamic GnRH release in the prepubertal male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Neuroendocrinology* 55:660–666.
- 64. Meeker RB, Greenwood RS and Hayward JN, 1994.** Glutamate receptors in the rat hypothalamus and pituitary. *Endocrinology* 134:621–629.
- 65. Mendis-Handagama SM and Ariyaratne HB, 200.** Differentiation of the adult Leydig cell population in the postnatal testis. *Biol Reprod* 65: 660-671.
- 66. Moenter SM, Woodfill CJI and Karsch FJ, 1991.** Role of the thyroid gland in seasonal reproduction: thyroidectomy blocks seasonal suppression of reproductive neuroendocrine activity in ewes. *Endocrinology* 128:1337-1344.

- 67. Muir AI, Chamberlain L, Elshourbagy NA, Michalovich D, Moore DJ, Calamari A, Szekeres PG, Sarau HM, Chambers JK, Murdock P, Steplewski K, Shabon U, Miller JE, Middleton SE, Darker JG, Larminie CG, Wilson S, Bergsma DJ, Emson P, Faull R, Philpott KL and Harrison DC, 2001.** AXOR12, a novel human G protein-coupled receptor, activated by the peptide KiSS-1. *J Biol Chem* 276: 28969–28975.
- 68. Murphy KG, 2005.** Kisspeptins: Regulators of Metastasis and the Hypothalamic-Pituitary-Gonadal Axis. *J Neuroendocrinology* 17: 519–525.
- 69. Nakanishi S, 1992.** Molecular diversity of glutamate receptors and implications for brain function. *Science* 258:597–603.
- 70. Navarro VM, Castellano JM, Fernández-Fernández R, Tovar S, Roa J., Mayen A, Barreiro ML, Casanueva F F, Aguilar E, Dieguez C, Pinilla L and Tena-Sempere M, 2004.** Effects of KiSS-1 Peptide, the Natural Ligand of GPR54, on Follicle-Stimulating Hormone Secretion in the Rat. *Endocrinology* 146: 1689-1697.
- 71. Nixon D. A., Akasha M. A., and Anderson C. R. (1988).** Free and total thyroid hormones in serum of Holstein cows. *J Dairy Sci* 71: 1152.-1160.
- 72. Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent A-S, Matagne V and Mungenast AE, 2006.** Minireview: The Neuroendocrine Regulation of Puberty: Is the Time Ripe for a Systems Biology Approach?. *Endocrinology*, doi:10.1210/en.2005-1136.
- 73. Parent A-S, Matagne V, and Bourguignon J-P, 2005.** Control of puberty by excitatory amino acid neurotransmitters and its clinical implications. 10.1385/ENDO: 28:3:281
- 74. Pin JP, Duvoisin R, 1995.** The metabotropic glutamate receptors: structure and functions. *Neuropharmacology* 34:1–26.
- 75. Plant TM, 1985.** A study of the role of the postnatal testes in determining the ontogeny of gonadotropin secretion in the male rhesus monkey (*Macaca mulatta*). *Endocrinology* 116: 1341–1350.
- 76. Price M, Olney J, Cicero T, 1978.** Acute elevations of serum luteinizing hormone induced by kainic acid, N-methyl aspartic acid or homocysteic acid. *Neuroendocrinology* 26: 352–358.
- 77. Rapisarda JJ, Bergman KS, Steiner RA and Foster DL, 1983.** Response to estradiol inhibition of tonic luteinizing hormone secretion decreases during the final stage of puberty in the rhesus monkey. *Endocrinology* 112 1172–1178.
- 78. Reddy II, Varshney VP, Sanwalt PC, Agarwal N and Pande JK, 1990.** Peripheral plasma estradiol 17/3 and progesterone levels in female goats induced hypothyroidism. *Small Ruminant Research* 22, 149-154.
- 79. Rekik M, Lassoued N, Yacoubi C, 2002.** Reproductive performances in ewe lambs of the Queue Fine de l'Ouest breed and their D'Man crosses following synchronisation. *Small Rumin. Res.* 45, 75–78.

- 80. Rimvall K, Martin DL, 1994.** The level of GAD67 protein is highly sensitive to small increases in intraneuronal gamma-aminobutyric acid levels. *J Neurochem* 62:1375–1381.
- 81. Roth Z, Meidan R, Shaham-Albalancy A, Braw-Tal R, and Wolfenson D, 2001.** Delayed effect of heat stress on steroid production in medium-sized and preovulatory bovine follicles. *Reproduction*; 121: 745 - 751.
- 82. Russel, AJF, Doney, JM and Gunn, RG, 1969.** Subjective assessment of fat in live sheep. *J. Agr. Sci., Cambridge*, 72: 451-454.
- 83. Santos, V.S. De los., 1973.** Climatología general de la región Lagunera. Boletín Agrícola Lagunero. SARH, México.
- 84. SAS 1991. SAS/SAT user's guide.** SAS Institute, Inc. Cary, N.C.
- 85. Schwartz HL, Strait KA and Oppenheimer JH. 1993.** Molecular mechanisms of thyroid hormone action. A physiologic perspective. *Clin Lab Med*; 13: 543-61.
- 86. Schneider JE, 2004.** Energy balance and reproduction. *Physiol Behav* 81:289–317.
- 87. Snedecor GW, and Cochran WG, 1967.** Statistical Methods. 6th ed. The Iowa State Univ. Press, Ames.
- 88. Shi ZD, Barrell GK, 1992.** Requirement of thyroid function for the expression of seasonal reproductive and related changes in red deer (*Cervus elaphus*) stages. *J Reprod Fertil* 94: 251–259.
- 89. Shupnik MA, Ridgway EC, and Chin WW, 1989.** Molecular biology of thyrotropin. *Endocr Rev* 10: 459-475.
- 90. Sommer B, Keinanen K, Verdoon TA, Wisden W, Burnashev N, Herb A, Kohler M, Takagi T, Sakmann B and Seeburg PH, 1990.** Flip and flop: a cell-specific functional switch in glutamate-operated channels in the CNS. *Science* 249:1580–1585.
- 91. Spicer LJ, Alonso J, Chamberlain CS, 2001.** Effects of thyroid hormones on bovine granulosa and thecal cell function in vitro: dependence on insulin and gonadotropins. *J Dairy Sci*; 84: 1069-1076.
- 92. Szkudlinski Mariusz W, Fremont Valerie, Ronin Catherine and Weintraub Bruce D, 2002.** Thyroid-Stimulating Hormone and Thyroid-Stimulating Hormone Receptor Structure-Function Relationships. *Physiol Rev* 82: 473-502.
- 93. Tata JR. 2007.** A hormone for all seasons. *Perspect. Biol. Med.* Winter; 50: 89-103.
- 94. Tena-Sempere M, 2005.** GPR54 and kisspeptin in reproduction. *Human Reproduction Update* 12: 631-639.
- 95. Terasawa E, Luchansky LL, Kasuya E and Nyberg CL, 1999.** An increase in glutamate release follows a decrease in gamma-aminobutyric acid and the pubertal

increase in luteinizing hormone releasing hormone release in female rhesus monkeys. *J Neuroendocrinol* 11: 275–282.

96. Terasawa E and DL Fernandez 2001. Neurobiological Mechanisms of the Onset of Puberty in Primates. *Endocrine Rev* 22: 111-151.

97. Tobet SA, Bless EP and Schwarting GA, 2001. Developmental aspect of the gonadotropin-releasing hormone system. *Molecular and Cellular Endocrinology* 185 173–184.

98. Thind KK, Goldsmith PC, 1997. Expression of estrogen and progesterone receptors in glutamate and GABA neurons of the pubertal female monkey hypothalamus. *Neuroendocrinology* 65: 314–324

99. Urbanski HF and Ojeda SR, 1990. A role for *N*-methyl-D-aspartate (NMDA) receptors in the control of LH secretion and initiation of female puberty. *Endocrinology* 126:1774–1776.

100. Vassart G and Dumont J E, 1992. The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr Rev* 13: 596–611.

101. van den Pol AN, 1991. Glutamate and aspartate immunoreactivity in hypothalamic presynaptic axons. *J Neurosci.* 11: 2087–2101.

102. van den Pol AN, Wuarin J-P and Dudek FE, 1990. Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* 250:1276–1278.

103. Verdoorn TA, Burnashev N, Monyer H, Seeburg PH, Sakmann B, 1991. Structural determinants of ion flow through recombinant glutamate receptor channels. *Science* 252:1715–1718.

104. Viguie C, Caraty A, Locatelli A and Malpoux B, 1995. Regulation of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) secretion by melatonin in the ewe II: changes in *N*-methyl-D,L- aspartic acid-induced LHRH release during the stimulation of luteinising hormone secretion by melatonin. *Biol Reprod* 52: 1156–1161.

105. Watkins J, Collingridge G, 1994. Phenylglycine derivatives as antagonists of metabotropic glutamate receptors. *Trends Pharmacol Sci.* 15: 333–342.

106. Wakim AN, Polizotto SL, Buffo MJ, Marrero MA, Burholt DR. 1995. Thyroid hormones in human follicular fluid and thyroid hormone receptors in human granulosa cells. *Fertil Steril* 59:1187-1190.

107. Watson RH, Gamble, LC, 1961. Puberty in the Merino ewe with special reference to the influence of season of birth upon its occurrence. *Aust. J. Agric. Res.* 12, 124–138.

108. Webster AJF, 1983. Environmental Stress and the Physiology, Performance and Health of Ruminants. *J Anim Sci.* 57:1584-1593.

109. Webster JR, Moenter SM, Barrell GK, Lehman MN and Karsch FJ, 1991. Role of the thyroid gland in seasonal reproduction. III. Thyroidectomy blocks seasonal

suppression of gonadotropin-releasing hormone secretion in sheep. *Endocrinology* 129:1635–1643.

110. Willmer P, Stone G, and Johnson I, 2005. *Environmental Physiology of Animals*, 2nd Ed. Blackwell Publishing, 705 pp.

111. Wilson SJ, Marion RS, Spain JN, Spiers DE, Keisler DH and Lucy MC 1998. Effects of controlled heat stress on ovarian function of dairy cattle. I. Lactating cows. *Journal of Dairy Science* 81 2124–2131. **Yen M. Paul, 2001.** Physiological and Molecular Basis of Thyroid Hormone Action. *Physiol. Rev.* 81: 1097-1142.

112. Wolfenson D, Lew BJ, Thatcher WW, Graber Y and Meidan R., 1997. Seasonal and acute heat stress effects on steroid production by dominant follicles in cows. *Animal Reproduction Science* 47, 9–19.

113. Young BA, Walker B, Dixon AE and Walker VA, 1989. Physiological Adaptation to the Environment. *J Anim Sci.* 67: 2426-2432.