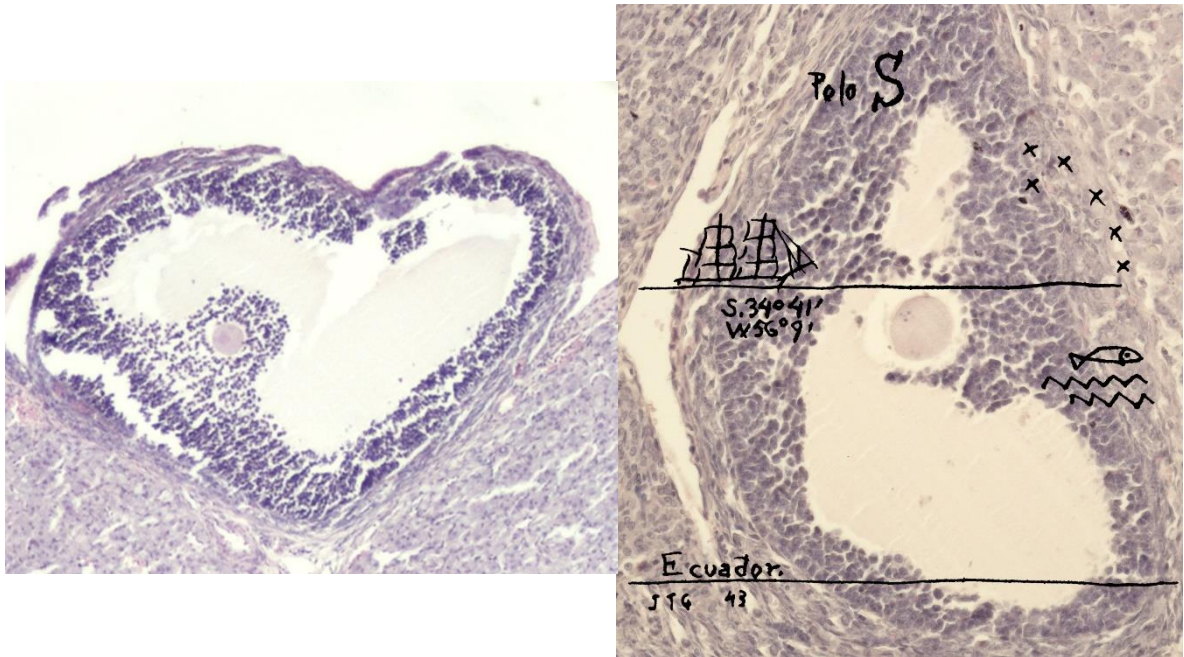


Diferencias en el desarrollo folicular y luteal durante el *heat* sexual en ratas ciclantes y posparturientas



Trabajo final de grado de la Licenciatura en Ciencias
Biológicas, profundización en Fisiología y Nutrición.

Lorena Bonjour

Tutora: Daniella Agrati

Co-tutora: Nibia Berois

AÑO 2019

AGRADECIMIENTOS

A mis tutoras, Daniella y Nibia, por la dedicación, las enseñanzas brindadas y los momentos compartidos.

A Natalia Uriarte y Flavio Zolessi, por aceptar evaluar mi tesis.

A Diego García Da Rosa, por la ayuda con las imágenes.

A mis padres, mis hermanos y Pipe, por el amor y ser mis guías de la vida.

Al “Mugrienteam”: Vane, Mai, Clara, Luli, Vale, Vivi y Dani, mis hermanas de la vida, por siempre estar presentes.

A Santi, mi compañero de vida, por su amor y apoyo incondicional.

A mis tíos, Tamem y Pocho, que comenzaron este camino conmigo y hoy me acompañan desde otro lado.

A todos mis amigos, en especial a César García, Matías Preza y Bruno Borges.

A mis suegros, Ceci y Tino, por todo el cariño.

A las Secciones de Fisiología y Nutrición, Biología Celular y Genética Evolutiva.

ÍNDICE

RESUMEN	3
INTRODUCCIÓN	5
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
RESULTADOS.....	19
DISCUSIÓN	28
BIBLIOGRAFÍA	34
ANEXOS I y II	

RESUMEN

La expresión del comportamiento sexual y de la ovulación en la rata hembra no solo ocurren en las fases de proestro tardío y estro de su ciclo estral, sino que se observan luego del parto, durante el estro posparto. Si bien los factores endócrinos principales que regulan la ovulación y la expresión del comportamiento sexual parecen ser comunes en hembras ciclantes y posparturientas, existen diferencias en la regulación del momento de expresión de máxima actividad sexual (*heat* sexual) y de la ovulación, sugiriendo que el desarrollo folicular y la ovulación difieren entre ambos estados fisiológicos. Sobre esta evidencia, hipotetizamos que el grado de desarrollo de los folículos ováricos durante el *heat* sexual difiere entre ratas ciclantes y posparturientas. Para probar esta hipótesis, en la presente pasantía, a través de un análisis histológico, comparamos el desarrollo folicular y luteal, así como la ovulación, en ovarios de ratas en proestro tardío (PRO, n=3) y en estro posparto (EPP, n=3) durante el *heat* sexual. Para ello, se extrajeron y se pesaron los ovarios de las hembras adultas PRO y las EPP, durante el *heat* sexual, 4 hs luego de apagada la luz y 12 hs posparto, respectivamente. Los ovarios fueron incluidos en parafina, cortados en micrótomos y teñidos con hematoxilina y eosina, para posteriormente analizar y cuantificar variables asociadas al desarrollo folicular, las características de los cuerpos lúteos y la presencia o ausencia de ovocitos en los oviductos. A partir de este análisis no encontramos diferencias en el número y tamaño de folículos ováricos pre-ovulatorios entre hembras PRO y EPP, y no detectamos ovulación en ninguna hembra. Sin embargo, los folículos de mayor tamaño de EPP presentaron menor grosor de la capa granulosa y un número mayor de los mismos se encontraban en proceso de atresia avanzada en comparación a lo observado en PRO. Con respecto al desarrollo luteal, las hembras EPP presentaron un menor número de cuerpos lúteos, pero de mayor tamaño y menor grado de regresión que las hembras PRO, con características esteroideogénicas propias de este período. Estos resultados sugieren que no hay diferencias drásticas en el desarrollo folicular entre ambos estados fisiológicos. Sin embargo, las diferencias en la capa granulosa y el mayor número de folículos atrésicos en las hembras EPP, indican que los cambios endócrinos propios de la gestación y el parto influyen en el desarrollo folicular. Asimismo, estas diferencias

invitan a continuar explorando el desarrollo folicular y los factores que lo regulan en el EPP. A través del empleo de marcadores específicos y al análisis de diferentes períodos dentro del período pre-ovulatorio, se podría avanzar en la comprensión del proceso de desarrollo folicular y ovulación en un período reproductivo particular como lo es el EPP.

INTRODUCCIÓN

La rata es un mamífero poliéstrico no estacional, de ovulación espontánea. Su ciclo estral es de 4 o 5 días y se divide en 4 fases: proestro, estro, metaestro y diestro; siendo la fase de diestro de mayor duración en las hembras que presentan ciclos de 5 días. Las hembras se encuentran sexualmente activas durante la noche del proestro tardío-estro temprano y la ovulación ocurre entrada ya la fase de estro. Las fases del ciclo estral pueden determinarse de forma poco invasiva a través de la observación de los tipos celulares obtenidos de exudados vaginales. El ciclo ovárico de estos mamíferos se caracteriza por presentar una breve fase luteal (o pseudo-luteal) y por ser fuertemente dependiente del fotoperíodo para su regulación (Hoffmann, 1968, 1969; Knobil & Neill, 2006).

Control endócrino del comportamiento sexual en la rata hembra

El comportamiento sexual de la rata hembra, comprende la expresión de componentes de búsqueda del macho, llamados comportamientos proceptivos, y el despliegue de la respuesta de lordosis frente a la monta, comportamiento que denota la receptividad sexual de la hembra. Este comportamiento ocurre durante las fases del proestro tardío y estro temprano del ciclo estral y es estrictamente dependiente del efecto activacional de estrógenos y progestágenos (Beach et al., 1942; Beach, 1976; Pfaus, et al., 1999). Si bien las hembras expresan el comportamiento por un período aproximado de 12 o 13 horas (Connor & Davis, 1980a; Södersten, 1985), la actividad y receptividad sexual es máxima, y los rechazos son mínimos, en el segundo tercio de la noche, aproximadamente 3-4 hs luego de apagarse la luz (Kuehn & Beach, 1963; Hardy, 1972). Definiremos a este momento de máxima actividad sexual como el *heat* sexual.

El aumento consecutivo en los niveles plasmáticos de estrógenos y progestágenos durante la fase de proestro (figura 1) es consecuencia del desarrollo de los folículos ováricos. En este sentido, la capa granulosa de los

folículos antrales en expansión secreta cantidades crecientes de estrógenos, alcanzándose niveles plasmáticos máximos de estrógenos en la mañana del proestro. Por otra parte, en respuesta a la hormona luteinizante (LH) la capa granulosa de los folículos pre-ovulatorios es responsable de inducir el pico pre-ovulatorio de progestágenos (Szołtys, 1976; Knobil & Neill, 2006). La elevación en los niveles plasmáticos de estos esteroides sexuales es suficiente para inducir comportamiento sexual en las hembras. Así, la administración de estradiol a hembras ovacteriomizadas induce altos niveles de lordosis (Davidson et al., 1968; Pfaff, 1970a), y la administración combinada de estrógenos seguida por progesterona aumenta significativamente el comportamiento sexual y reduce los rechazos (Boling & Blandau, 1939; Tennent, et al., 1980; Södersten & Eneroth, 1981; Södersten, 1985). Cabe destacar que la administración de estas hormonas induce comportamiento sexual incluso en hembras que a su vez hubieran sido hipofisectomizadas (Pfaff, 1970b).

Expresión del comportamiento sexual en diferentes estados fisiológicos: proestro tardío vs. estro posparto

De forma interesante, el comportamiento sexual, además de observarse en las fases de proestro tardío y estro temprano, también se desarrolla luego del parto durante el estro posparto. Dicho período ocurre durante las primeras 24 hs siguientes al parto (Connor & Davis, 1980a). Si ocurre una cópula fértil en el estro posparto, la hembra es capaz de gestar una camada mientras cuida a otra simultáneamente (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980).

El comportamiento sexual de las hembras en estro posparto (EPP) durante el *heat* sexual es similar al exhibido por hembras en proestro tardío (PRO) (Connor & Davis, 1980a; Agrati, 2009). Como se observa en la figura 2, la expresión de componentes proceptivos y receptivos del comportamiento sexual durante la interacción con un macho, no difiere entre hembras ciclantes en proestro y posparturientas, sean estas últimas primíparas o multíparas (es decir durante su primer o segundo parto, respectivamente). De igual forma, ambos períodos de máxima actividad sexual son anteceditos por aumentos en

los niveles de estrógenos y progestágenos (figura 1). Así, los niveles de estrógenos aumentan previo al parto y se mantienen elevados a las 3 hs posparto, disminuyendo significativamente hacia las 6 hs. Los niveles de progestágenos se incrementan significativamente desde las 3 hs posparto, alcanzando niveles máximos cerca de las 12 hs (Connor & Davis, 1980b). Diferentes trabajos muestran que el *heat* sexual durante el EPP ocurre a las 12 hs del inicio del mismo (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980; Carrillo-Martínez et al., 2011).

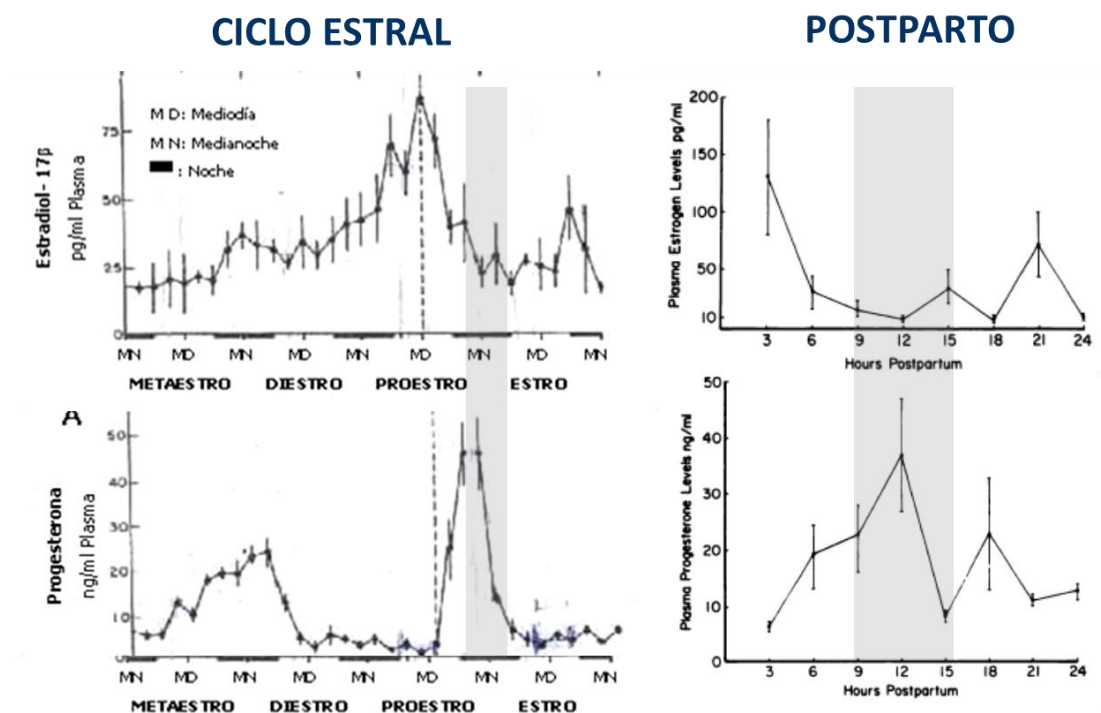


Figura 1. Niveles plasmáticos de estrógenos y progesterona de hembras ciclantes en las 4 fases del ciclo estral y de hembras posparturientas. La barra gris representa el período aproximado de actividad sexual. Adaptada de Knobil & Neill, 2006 y de Connor & Davis, 1980b.

A pesar de estas similitudes, la regulación a nivel neuroendócrino del *heat* sexual luego del parto presenta algunas diferencias en comparación al ciclo ovárico. En este sentido, el *heat* sexual en hembras parturientas ocurre aproximadamente de 12 (Connor & Davis, 1980a) a 15 hs luego de iniciado el parto (Carrillo-Martínez et al., 2011) si las hembras paren temprano en la fase de luz del ciclo luz:oscuridad. Sin embargo, si las hembras paren en la tarde-noche,

expresarán comportamiento sexual la noche siguiente (Blandau & Soderwall, 1941). Esto significa que el EPP, es regulado tanto por la hora del parto (Connor & Davis, 1980a; Gilbert et al., 1980; Carrillo-Martínez et al., 2011), como por el fotoperíodo (Blandau & Soderwall, 1941).

En relación a la ovulación, las hembras ciclantes ovulan en la mañana del estro, luego de culminado el período de receptividad sexual (Knobil & Neill, 2006), mientras que en las hembras posparturientas la ovulación ocurriría previo o durante el período de *heat* sexual. Existen reportes inconsistentes en relación a la hora de la ovulación: mientras que Connors & Davis (1980b) observan ovulación entre las 3 y 18 hs luego del parto, otros estudios reportan este fenómeno entre las 12 y 14 hs (Hashizume et al., 1973a) y entre 15 y 18 hs luego del parto (Ying et al., 1973; Takiguchi et al., 2004). Por otra parte, la ovulación durante el posparto en hembras que paren luego de apagada la luz se retrasa hasta la mañana del tercer día posparto (Hashizume et al., 1973a).

Esta diferencia en la hora aproximada de la ovulación entre hembras PRO y EPP parece vincularse a variaciones en la liberación de LH entre ambos estados fisiológicos. Así, Hoffmann & Schwartz (1965) mostraron que el pico de LH, responsable de la ovulación y del aumento de progesterona necesario para la expresión del comportamiento sexual, puede comenzar antes y culminar más tarde en hembras posparturientas que en las ciclantes. En este sentido, la liberación de LH en el posparto está estrechamente relacionada con el final del parto (Hashizume et al., 1973b), y alcanza su pico entre 3 y 10 hs después del mismo (Ying et al., 1973; Taya & Sasamoto, 1981). En las ratas ciclantes, en cambio, la LH comienza a elevarse en la tarde del proestro, alcanzando rápidamente su nivel más alto entre 1 y 2 hs antes del inicio del período de oscuridad (Smith et al., 1975).

En conjunto, estas diferencias en la regulación de la ovulación y de la expresión del comportamiento sexual entre el PRO y el EPP sugieren diferencias en el desarrollo folicular entre ambos períodos reproductivos.

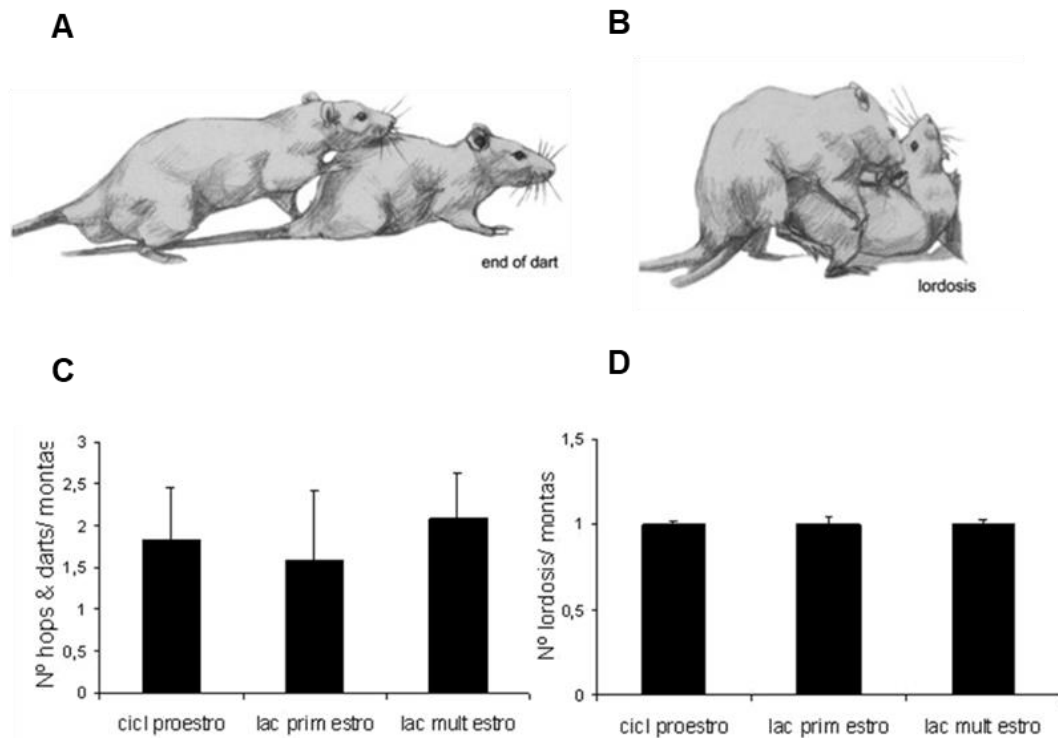


Figura 2. Los paneles superiores, A y B, representan la culminación de una conducta proceptiva y la postura de lordosis, respectivamente. Tomado de Snoeren et al., 2014. En el panel C se muestra el número de comportamientos proceptivos en función del número total de montas del macho y en el D el cociente de lordosis (número de lordosis sobre número total de montas) de hembras vírgenes ciclantes en proestro (cicl proestro) y lactantes en estro posparto primíparas (lac primestro) y multíparas (lac multestro). Los datos se expresan como mediana (RSIQ). $P=NS$, análisis de varianzas de una vía de Kruskal Wallis. Tomado de Agrati, 2009.

Desarrollo folicular y luteal durante el proestro y el posparto

Desarrollo folicular

Debido a la regulación del desarrollo folicular a lo largo del ciclo ovárico, existe predominancia de folículos de diferentes grados de desarrollo, y por ende, de tamaño a lo largo del ciclo estral. Así, el estro se caracteriza por presentar folículos de tamaño entre 275 a 400 μm , el metaestro entre 350 a 400 μm , el diestro entre 450 a 575 μm y durante el proestro se identifican folículos preovulatorios de más de 575 μm distribuidos en la superficie de la corteza ovárica (Hirshfield & Rees Midgley, 1978; Gaytán et al., 1996; Yoshida et al., 2009).

En relación al desarrollo folicular el día del parto, es importante señalar que desde el inicio de la gestación hasta el día 22 (día anterior al parto), el número de folículos se mantiene relativamente constante y principalmente se observan folículos de tamaños entre 300 a 500 μm . A partir de los días 19-20 de gestación se observa la presencia de folículos, probablemente preovulatorios, de más de 500 μm de diámetro, detectándose un mayor número de folículos de más de 600 μm el día 22 y el día del parto (Greenwald, 1966; Richards & Kersey, 1979).

Los folículos preovulatorios, también llamados folículos de Graaf ($>500 \mu\text{m}$) (Knobil & Neill, 2006) se caracterizan por presentar una única cavidad antral grande con líquido folicular, un *cumulus-oophorus* bien formado (Yoshida et al., 2009), capa granulosa delgada con varias capas celulares, una teca interna vascularizada y una teca externa diferenciada (Boling et al., 1941). El tamaño del ovocito en estos folículos se estima entre 85-90 μm de diámetro (Deane, 1952). Por acción de la LH, durante el período preovulatorio, estos folículos crecen de forma acelerada previo a la ovulación (inflamación preovulatoria) hasta la ruptura, y cerca o inmediatamente después de la ovulación, se pueden detectar folículos con ruptura de teca y granulosa (Boling et al., 1941).

Es importante destacar que no todos los folículos presentes en el ovario de la rata al nacimiento serán ovulados, ya que, independientemente de su tamaño o etapa de desarrollo, la mayoría de los folículos sufren atresia, proceso degenerativo por el cual se eliminan (Knobil & Neill, 2006; Escobar et al., 2013). De hecho en la rata, el 70% de los folículos antrales son atrésicos (Hsueh et al., 1994).

Los folículos atrésicos al igual que los sanos, poseen una actividad esteroideogénica importante durante las etapas avanzadas de su desarrollo, por lo que el proceso atrésico puede servir, además de la eliminación de los folículos, como función endócrina intra-ovárica (Hsueh et al., 1994). A pesar de ser el proceso más común en el ovario, desconocemos si la atresia de los folículos preovulatorios luego del parto difiere de la observada en el ciclo ovárico.

Debido a que no existe información acerca del desarrollo folicular durante el *heat* sexual luego del parto, y en función a los antecedentes previamente descritos, que sugieren que la ovulación ocurriría más cerca del *heat* sexual en las hembras en EPP que en las hembras en PRO, es posible suponer que el desarrollo de los folículos preovulatorios se encontrará más avanzando en las hembras en EPP que en las hembras en PRO durante este período de máxima actividad sexual.

Cuerpos lúteos

Las hembras en proestro tardío presentan cuerpos lúteos en regresión procedentes de ciclos ováricos anteriores (Long, 1973; Westwood, 2008; Yoshida et al., 2009; Sato et al., 2014; Gaytán et al., 2017). Cada generación de cuerpos lúteos persiste morfológicamente por 12 a 14 días y se distinguen por su tamaño (Boling, 1942). La regresión de los cuerpos lúteos se identifica por la presencia de áreas de degeneración, la oclusión de los vasos sanguíneos y la infiltración de leucocitos (Bassett, 1943).

Los cuerpos lúteos de hembras que no copularon secretan bajos niveles de progesterona durante la fase de metaestro para luego degenerar. En cambio, si las hembras copulan la glándula pituitaria secreta cantidades suficientes de prolactina, que “rescata” a los cuerpos lúteos hasta aproximadamente la mitad de la gestación. A partir de este momento, la placenta secreta hormonas luteotróficas (lactógeno placentario), que mantienen los cuerpos lúteos durante la fase final de la preñez (Knobil & Neill, 2006).

Durante el EPP se observan dos tipos de cuerpos lúteos diferenciables, ambos de mayor volumen que los del ciclo ovárico: unos de mayor tamaño (provenientes de la preñez), y otros de menor tamaño (provenientes de ciclos anteriores) (Bruce et al., 1984; Kurusu et al., 2009). Ambos tipos de cuerpos lúteos presentan características estereoidogénicas (Bruce et al., 1984, Bruce et al., 2001), como consecuencia de la exposición a elevados niveles de prolactina y lactógenos placentarios de la preñez (Takiguchi et al., 2004; Knobil & Neill, 2006). Sin embargo, es interesante señalar que estos cuerpos lúteos se encuentran en regresión como consecuencia del pico preovulatorio de prolactina

del EPP, que a diferencia de la prolactina gestacional, posee un papel luteolítico (Gaytán et al., 1998; Takiguchi et al., 2004; Kurusu et al., 2009).

Si bien se han realizado estudios histológicos de la morfología ovárica en las fases de PRO y EPP, no hemos encontrado análisis comparativos de las características ováricas, desarrollo folicular y luteal y ovulación, entre ambos estados fisiológicos durante el *heat* sexual. Por consiguiente, en la presente pasantía comparamos el desarrollo folicular y luteal en ovarios de ratas en proestro tardío y en estro posparto durante el *heat* sexual.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

Hipótesis

El grado de desarrollo de los folículos ováricos durante el *heat* sexual difiere entre ratas ciclantes y posparturientas.

Objetivo general

Comparar el desarrollo folicular y luteal de ovarios de ratas durante el *heat* sexual en dos estados fisiológicos diferentes: proestro tardío y estro posparto.

Objetivos específicos

- I) Comparar el peso de los ovarios de hembras adultas en proestro tardío y en estro posparto durante el *heat* sexual.
- II) Realizar la puesta a punto de las técnicas de análisis histológicos (protocolos de inclusión en parafina y tinción con hematoxilina y eosina) para las muestras.

- III) Comparar, mediante análisis histológicos, el desarrollo folicular, las características de los cuerpos lúteos y la presencia o ausencia de ovocitos en los oviductos de ovarios de hembras adultas en proestro tardío y en estro posparto durante el *heat* sexual.

MATERIALES Y MÉTODOS

Estrategia experimental

Con el fin de probar la hipótesis planteada se analizaron los ovarios provenientes de hembras (*Rattus norvegicus*, cepa Wistar) adultas de la misma edad (aproximadamente 5 meses de vida), en proestro tardío (4 hs luego de apagada la luz) y estro posparto (12 hs luego de iniciado el parto). Estos tiempos fueron seleccionados para garantizar que ambos grupos hubieran alcanzado la máxima actividad sexual, *heat* sexual al momento de la extracción (Kuehn & Beach, 1963; Hardy, 1972; Connor & Davis, 1980a).

Obtención y preparación de las muestras

Las hembras fueron sacrificadas por decapitación, de acuerdo a los tiempos predefinidos, y se extrajeron rápidamente los ovarios y cerebros, estos últimos con el objetivo de estimar la densidad de receptores dopaminérgicos a través de autorradiografía. Inmediatamente previo al sacrificio se verificó que las hembras estuvieran sexualmente receptivas. El protocolo experimental utilizado fue aprobado por el CEUA de la Facultad de Ciencias, 2012. Los ovarios fueron fijados en formaldehído al 4% en buffer fosfato 1X para su posterior análisis.

Los ovarios fijados provenientes de 4 hembras de cada grupo (PRO y EPP) fueron disecados, de manera de quitar el tejido adiposo que los rodeaba y

pesados. Posteriormente éstos fueron incluidos en parafina. En forma resumida, la inclusión comprendió una primera etapa de deshidratación en alcoholes de graduación creciente (70, 95 y 100%), varios pasos de inmersión en un líquido intermedio (cloroformo I, II y III) y el embebido en 3 parafinas líquidas a 60°C (punto de fusión: 58°C), previo a la confección de los bloques finales. Se adjunta protocolo de inclusión en parafina utilizado en anexo I.

Corte, tinción y análisis

Corte y tinción

Con el fin de estimar el grado de desarrollo folicular y luteal, se cortaron con micrótomó Reichert-Jung modelo 1130 Biocut los ovarios incluidos de 3 hembras PRO y de 3 hembras EPP, obteniendo 8 cortes de 7,0 µm de espesor cada 100 µm. Esta distancia de avance fue seleccionada debido a que el objetivo principal de este trabajo fue el análisis de folículos antrales en expansión y teniendo en cuenta que el tamaño estimando del complejo óvulo-*cumulus* es superior a 100 µm (Deane, 1952). Se seleccionaron los portaobjetos con los cortes a ser analizados y se tiñeron con hematoxilina de Mayer y eosina al 1%. Se adjunta protocolo utilizado en anexo II.

Análisis

Debido a que en este trabajo nuestro interés se centró en la comparación de los folículos ováricos en fases finales de su desarrollo (mayores a 575 µm), y tomando en consideración el tiempo empleado en el análisis histológico de los ovarios, se decidió realizar el análisis cada 300 µm. Sin embargo, con el fin de validar la decisión y estimar la pérdida de información al analizar las estructuras (número y tamaño de folículos y cuerpos lúteos) cada 300 µm, se comparó el análisis histológico de 4 ovarios de distintas hembras, 2 de PRO y 2 de EPP, cada 150 y 300 µm.

La presencia o ausencia de ovocitos y *cumulus* en los oviductos fue analizada en los cortes teñidos cada 150 µm empleando microscopio fotónico.

Para casos donde no fuera clara la identificación de dichas estructuras, se tiñeron y analizaron los cortes adyacentes.

La cuantificación y medición de los folículos y cuerpos lúteos se realizó a partir de la reconstrucción de cada ovario. Brevemente, se fotografiaron los cortes (uno de cada 8) con cámara fotográfica Nikon DS-5Mc-U2 digital cooled en microscopio Nikon Eclipse 80i 241, con objetivo 4X.

Se realizó la reconstrucción anteroposterior de los mismos mediante el ensamblaje de las fotos (Figura 3). Esto permitió el seguimiento de los folículos y de los cuerpos lúteos en la secuencia de cortes. A cada estructura se le asignó un número correlativo según su orden de aparición y se cuantificaron y midieron aquellos folículos antrales mayores a 275 μm y cuerpos lúteos mayores a 400 μm en cada uno de los ovarios, como se detalla a continuación.

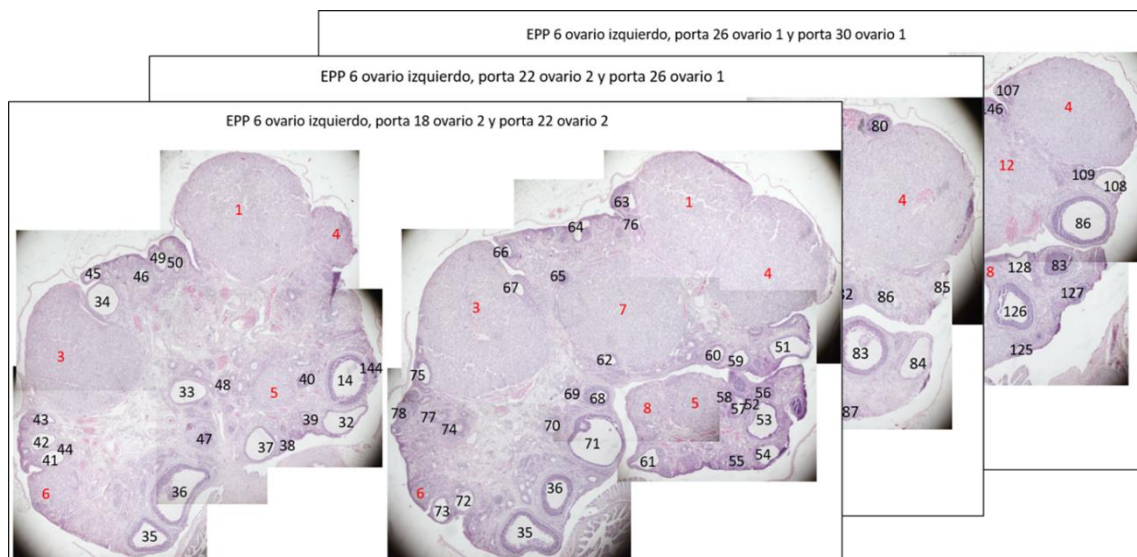


FIGURA 3. Ejemplo de reconstrucción anteroposterior de los ovarios en PowerPoint.

Para el procesamiento de las imágenes a 4X se utilizó el programa ImageJ de NHI (Schneider et al., 2012), con el que se midieron los tamaños de los folículos (eje longitudinal mayor), los grosores mínimo y máximo de la capa granulosa (tomándose como mínimo la zona más fina de la capa granulosa y como máximo la zona más gruesa de la capa donde no formara parte del

cumulus-oophorus). Se cuantificó la cantidad de folículos atrésicos clase II, de acuerdo al criterio que se especifica a continuación. A su vez, se midieron los tamaños de los cuerpos lúteos en el eje longitudinal mayor.

Los tamaños de folículos y cuerpos lúteos obtenidos a través de este análisis son estimativos, pudiéndose haber subestimado el tamaño máximo de estas estructuras, ya que la medida se realizó cada 300 μm . Esto se ejemplifica en la figura 4. Cabe destacar que el error de estimación de tamaño de los folículos pre-ovulatorios (de mayor tamaño) en 4 ovarios analizados a 150 y 300 μm fue menor al 5% (ver Resultados: página 20, Tabla 1).

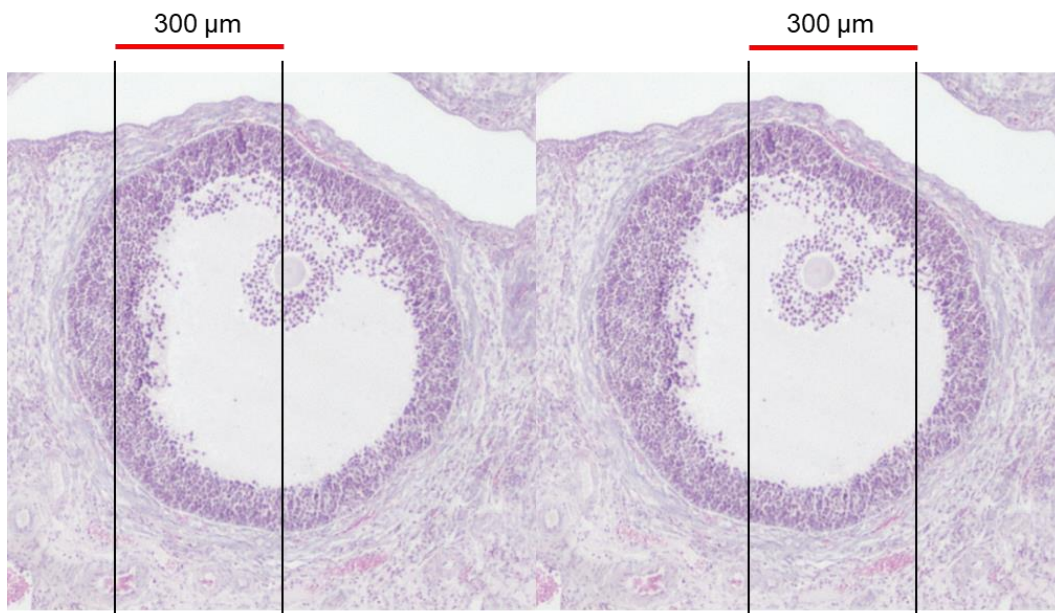


FIGURA 4. Representación de los sitios donde se podría estar realizando la medición de tamaño de los folículos.

Clasificación de folículos

Los folículos antrales en expansión (mayores a 275 μm) fueron clasificados de acuerdo a Osman, (1985) y Gaytán et al., (1996), quienes establecen 5 clases de folículos antrales, de acuerdo a su tamaño como se detalla en la figura 5. Debido al bajo número de folículos presentes en las clases

3 y 4, se decidió unir ambas categorías con el fin de poder explorar características cuantitativas asociadas a la distribución de tamaños.

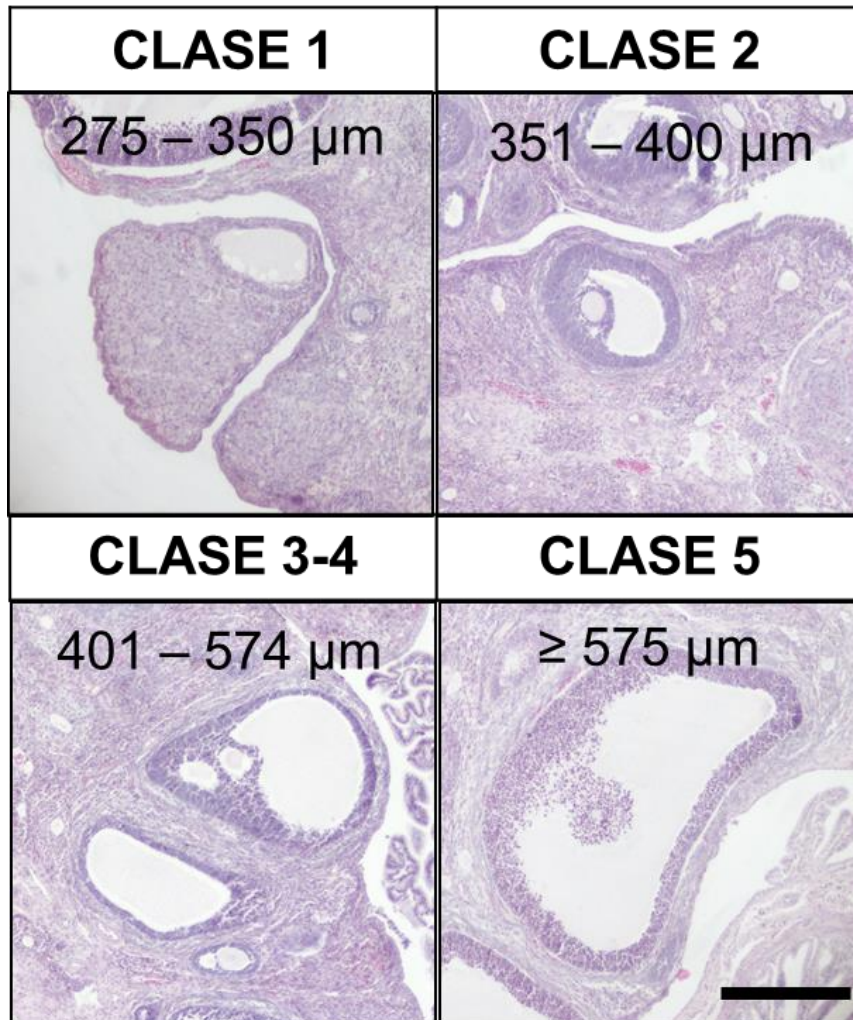


FIGURA 5. Clasificación de folículos (Clases: 5, 3-4, 2 y 1); *: las clases 3 y 4 de 401 a 450 μm y de 451 a 574 μm respectivamente, fueron unidas; la barra representa 275 μm .

Atresia folicular

Elegimos cuantificar para este trabajo aquellos folículos con mayor grado de atresia (folículos atrésicos clase II de acuerdo a Gaytán et al., 1996), dada la baja complejidad de su identificación. En este sentido, Gaytán et al., (1996), sugieren que pueden identificarse dos grados de atresia, I y II, definiendo que en la I los folículos presentan alteraciones en la capa granulosa y en la II, además

de las alteraciones de tipo I, se observan alteraciones en los ovocitos. Asimismo, dentro de cada categoría (I y II) los autores subclasifican en a y b, siendo “a” la que presenta menor grado de atresia. De lo antedicho se desprende que la clase I presenta menor grado de atresia que la II, así como “a” presenta menor grado de atresia que “b”, quedando ordenadas de menor a mayor, según grado de atresia, del siguiente modo: Ia, Ib, IIa y IIb. Los folículos atrésicos clase II se caracterizan por mostrar alteraciones de la capa granulosa, reanudación de la meiosis, fragmentación del ovocito y presencia de macrófagos en el antro.

Cuerpos lúteos

Se cuantificaron y midieron todas las estructuras con características celulares que presentaran capacidad esteroidogénica, mayores a 400 μm , para garantizar que se correspondieran al objeto de estudio. En este sentido, las estructuras de menor tamaño no presentan siempre una teca que los defina como estructuras individuales (Bruce et al., 1984). Debido a la gran disparidad en tamaños, se cuantificó el número de cuerpos lúteos mayores a 1000 μm por ovario como índice de gran tamaño, así como el mayor tamaño de cuerpo lúteo registrado en cada ovario.

A su vez, se registró de forma cualitativa la presencia de células tipo estereoidogénicas y los signos de regresión luteal (Sato et al., 2014; Gaytán et al., 2017).

Los resultados cuantitativos se expresaron en medias $\pm$ error estándar, y en el caso que fue posible, los estados fisiológicos PRO y EPP fueron comparados mediante el test t de Student para muestras independientes. Por otra parte, las características de los folículos en las diferentes clases, dentro de cada estado fisiológico, fueron analizadas mediante ANOVA de medidas repetidas, seguido del test *post hoc* de Tukey. Las características cualitativas a destacar se muestran en figuras a mayor aumento.

RESULTADOS

Peso de los ovarios

El peso de los ovarios de EPP: $77,2 \pm 3,0$ mg, fue significativamente mayor al de los ovarios de PRO: $65,8 \pm 2,4$ mg ($t_{(6)} = -2,9$; $p = 0,03$).

Técnicas de inclusión y tinción

Las etapas de inclusión y tinción fueron realizadas siguiendo los protocolos de la Sección Biología Celular de la Facultad de Ciencias. Respecto al protocolo de inclusión, y con el objetivo de asegurar una buena impregnación en parafina de los órganos a analizar, ovarios de ratas, se pusieron a punto los tiempos de inmersión de las muestras en las parafinas I, II y III del protocolo base. Se observó que se requieren 45 minutos en cada una de las parafinas para lograr una impregnación adecuada. Con respecto al protocolo de tinción, se utilizó hematoxilina de Mayer y eosina al 1% y también se realizaron ajustes en los tiempos de coloración para obtener una tinción de buena calidad. Se anexan los protocolos utilizados (Anexo I y II).

Comparación del análisis histológico de los ovarios cada 150 μ m y 300 μ m de distancia

Como se observa en la tabla 1, la pérdida del número de folículos y cuerpos lúteos totales identificados al realizar el análisis cada 300 μ m en relación a 150 μ m para ambos grupos, hembras PRO y hembras EPP, es de aproximadamente un 30% y un 12%, respectivamente. La diferencia en la estimación del tamaño de los folículos de mayor tamaño, clase 5 y clase 3-4 y de los cuerpos lúteos entre el análisis a 150 y 300 μ m no superó el 6%.

TABLA 1. Diferencias en la estimación del número y del tamaño de folículos y cuerpos lúteos, expresadas en porcentaje, entre el análisis de los ovarios cada 150 y 300 μm de distancia

	FOLÍCULOS					CUERPOS LÚTEOS	
	Número Total	Número clase 5	Número clase 3-4	Tamaño clase 5	Tamaño clase 3-4	Número	Tamaño
PRO (n=2)	29,6 $\pm$ 6,1	25,4 $\pm$ 3,8	37,7 $\pm$ 0,9	3,8 $\pm$ 1,3	6,1 $\pm$ 1,5	13,2 $\pm$ 5,8	1,5 $\pm$ 0,3
EPP (n=2)	31,5 $\pm$ 1,7	12,5 $\pm$ 8,8	25, 0 $\pm$ 0,0	4,4 $\pm$ 0,4	5,8 $\pm$ 3,1	9,8 $\pm$ 3,7	4,6 $\pm$ 2,6
TOTAL (n=4)	30,5 $\pm$ 3,2	19,0 $\pm$ 5,8	31,3 $\pm$ 3,2	4,1 $\pm$ 0,7	5,9 $\pm$ 1,7	11,5 $\pm$ 3,5	3,0 $\pm$ 1,5

Los datos se expresan como medias $\pm$ error estándar. PRO: ovarios de hembras en proestro y EPP: ovarios de hembras en estro posparto. Número de ovarios analizados expresado entre paréntesis.

Análisis histológico

No se identificaron ovocitos en los oviductos de las 3 hembras en PRO ni de las 3 hembras en EPP.

Desarrollo folicular

La figura 6 ilustra los diferentes grados de desarrollo folicular (clases de folículos) observados tanto en los ovarios de PRO como de EPP.

El número total de folículos no presentó diferencias significativas entre EPP (135,0 $\pm$ 25,1) y PRO (91,7 $\pm$ 7,1) ($t_{(4)} = -1,36$; $p = 0,25$). Como se muestra en la tabla 2, tampoco encontramos diferencias en el número de folículos dentro de cada clase (clase 5: $t_{(4)} = 0,06$, $p = 0,95$; clase 3-4: $t_{(4)} = 0,87$, $p = 0,43$; clase 2: $t_{(4)} = 0,29$, $p = 0,79$; clase 1: $t_{(4)} = -0,96$, $p = 0,39$).

Tanto los ovarios de PRO ($F_{(3,6)} = 33,4$; $p < 0,01$) como de EPP ($F_{(3,6)} = 6,9$; $p < 0,05$) presentaron una mayor proporción de folículos clase 1 respecto al resto de las clases ($p < 0,05$ para todas las comparaciones, Tukey *post hoc* test, Tabla 2).

En referencia al tamaño medio de los folículos en cada clase, no se observan diferencias significativas entre las condiciones PRO y EPP (tabla 2, clase 5: $t_{(4)} = -0,72$, $p = 0,51$; clase 3-4: $t_{(4)} = 1,05$, $p = 0,35$; clase 2: $t_{(4)} = -0,06$, $p = 0,96$; clase 1: $t_{(4)} = 0,64$, $p = 0,55$).

TABLA 2. Porcentaje de folículos en cada clase y tamaño (μm) de los mismos, en ovarios PRO y EPP

		CLASE 5	CLASE 3-4	CLASE 2	CLASE 1
% DE FOLÍCULOS	PRO	$18,8 \pm 1,3$	$22,1 \pm 2,0$	$17,2 \pm 0,4$	$42,0 \pm 0,7^*$
	EPP	$18,5 \pm 2,7$	$19,6 \pm 1,3$	$16,9 \pm 0,8$	$45,0 \pm 2,4^*$
TAMAÑO (μm)	PRO	$694,3 \pm 9,9$	$468,4 \pm 0,7$	$373,0 \pm 2,7$	$308,2 \pm 1,3$
	EPP	$709,9 \pm 14,6$	$456,8 \pm 9,1$	$373,2 \pm 1,8$	$305,7 \pm 2,8$

PRO: proestro (n=3) y EPP: estro posparto (n=3). Los datos se expresan como medias $\pm$ error estándar. Prueba t de Student, $p = \text{ns}$ para todas las comparaciones. En % de folículos *: $p < 0,05$ vs clases 5, 3-4 y 2, Tukey *post hoc* test, dentro de cada estado fisiológico.

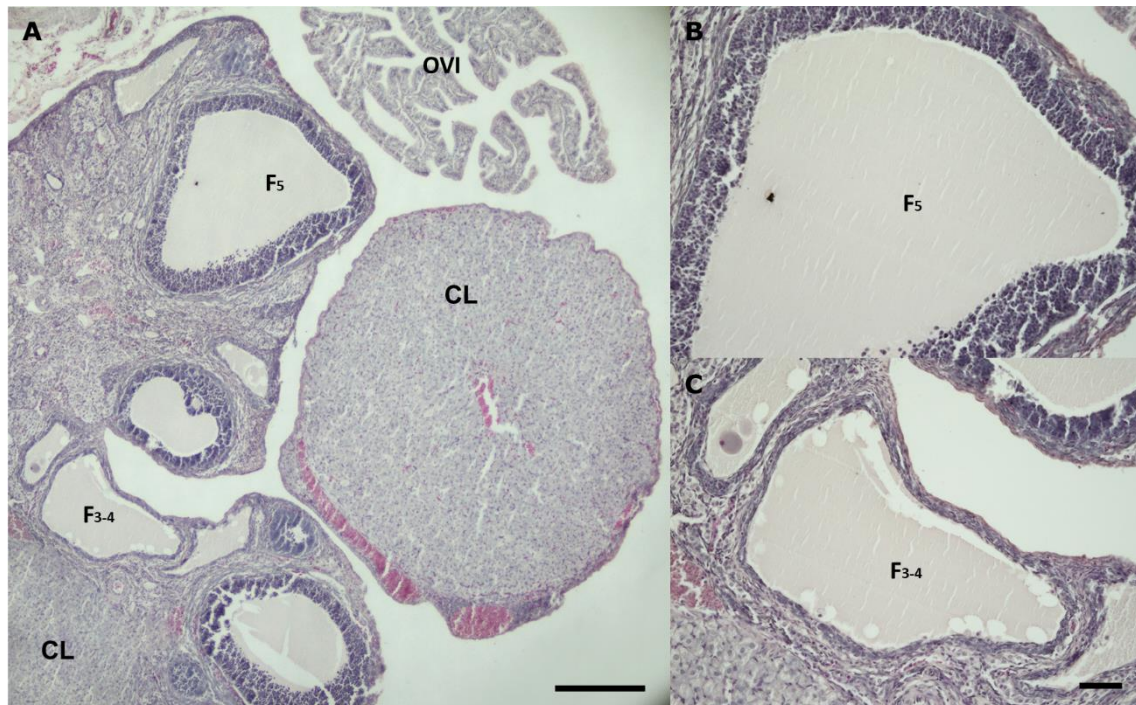


FIGURA 6. Ejemplos de folículos ováricos observados de las clases 3-4 (F3-4) y 5 (F5) en un corte de ovario de hembra estro posparto a menor (panel A, la barra representa $275 \mu\text{m}$) y mayor aumento (paneles B y C, la barra representa $50 \mu\text{m}$). (OVI) oviducto, (CL) cuerpo lúteo.

Sin embargo, se observaron diferencias significativas en el grosor de la capa granulosa de los folículos de mayor tamaño entre los ovarios de hembras PRO y EPP. Como se muestra en la Figura 7, el grosor máximo de la granulosa fue significativamente mayor en los folículos de las clases 5, 3-4 y 2 de ovarios PRO respecto a ovarios EPP (clase 5: $t_{(4)} = 2,74$, $p = 0,05$; clase 3-4: $t_{(4)} = 4,43$, $p = 0,01$; clase 2: $t_{(4)} = 2,81$, $p = 0,05$). El grosor de la granulosa no difirió en los folículos de clase 1 ($t_{(4)} = 0,48$, $p = 0,66$). Por otra parte, el grosor máximo de la capa granulosa de los folículos tanto de PRO ($F_{(3,6)} = 22,6$; $p < 0,05$) como de EPP ($F_{(3,6)} = 58,6$; $p < 0,01$) fue significativamente mayor en los folículos clase 5 respecto al resto de las clases ($p < 0,05$ para todas las comparaciones, Tukey *post hoc* test, Figura 7). A su vez, los folículos de EPP clase 3-4 presentaron granulosa más finas que los folículos clase 1 ($p < 0,05$).

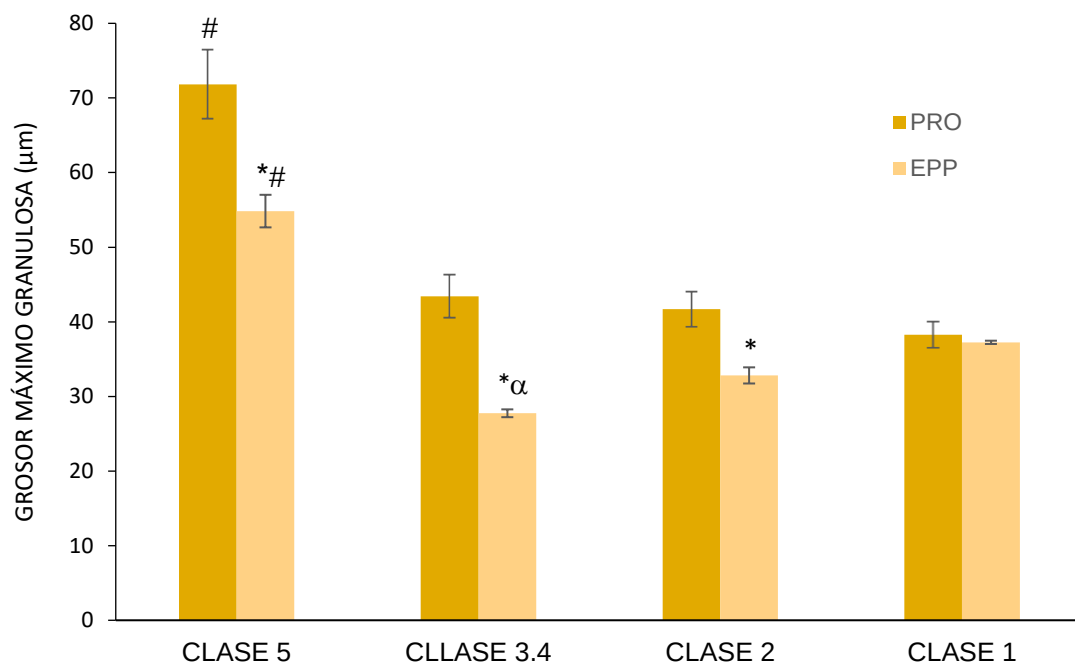


FIGURA 7. Grosor máximo (μm) de la capa granulosa de los folículos agrupados por clase de ovarios de hembras en proestro (PRO, n=3) y en estro posparto (EPP, n=3). Los datos se expresan como medias ± error estándar. *: $p \leq 0,05$, prueba t de Student; #: $p < 0,05$ vs clase 3-4, 2 y 1, y α: $p < 0,05$ vs clase 1 dentro de un estado, Tukey *post hoc* test.

Del mismo modo, también se encontraron diferencias significativas en los grosores mínimos de las capas granulosas entre PRO y EPP para las clases 5 y 3-4 (clase 5: $t_{(4)} = 4,55$, $p = 0,01$; clase 3-4: $t_{(4)} = 4,81$, $p = 0,01$). Pero no detectamos diferencias significativas para las clases 2 y 1 (clase 2: $t_{(4)} = 1,57$, $p = 0,19$ y clase 1: $t_{(4)} = 0,03$, $p = 0,98$, Figura 8). A su vez, el grosor mínimo de la capa granulosa de los folículos tanto de PRO ($F_{(3,6)} = 26,79$; $p < 0,01$) como de EPP ($F_{(3,6)} = 84,73$; $p < 0,01$) fue mayor en los folículos clase 5 respecto al resto de las clases ($p < 0,05$ para todas las comparaciones, Tukey *post hoc* test, Figura 8). Los folículos de EPP clase 3-4 presentaron granulosas más finas que los folículos clase 1 ($p < 0,05$).

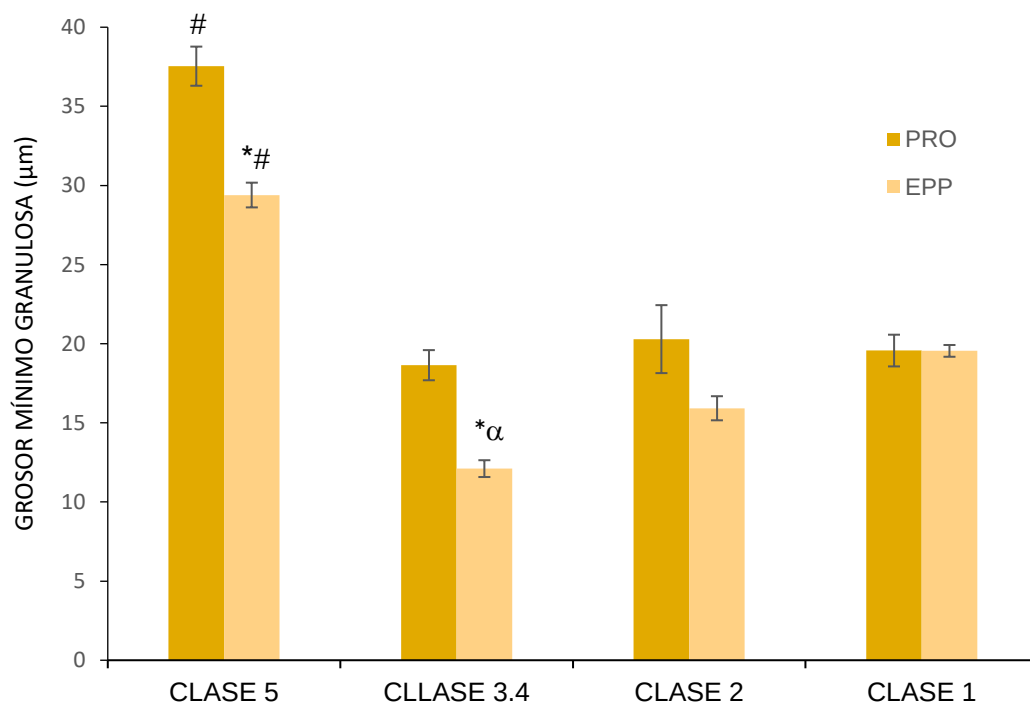


FIGURA 8. Grosor mínimo de la capa granulosa (μm) de los folículos agrupados por clase de ovarios de hembras en proestro (PRO, n=3) y en estró postparto (EPP, n=3). Los datos se expresan como medias $\pm$ error estándar. *: $p \leq 0,05$, prueba t de Student; #: $p < 0,05$ vs clase 3-4, 2 y 1, y α : $p < 0,05$ vs clase 1 dentro de un estado, Tukey *post hoc* test.

Por otra parte, el porcentaje de folículos atrésicos fue significativamente mayor en EPP para las clases 5 y 3-4 (clase 5: $t_{(4)} = -3,22$, $p = 0,03$ y clase 3-4: $t_{(4)} = -3,92$, $p = 0,02$) y tendió a ser mayor para las clase 2 y 1 (clase 2: $t_{(4)} = -2,18$, $p = 0,1$; clase 1: $t_{(4)} = -2,39$, $p = 0,08$) en comparación a los ovarios PRO (Figura 9). Sin embargo, el porcentaje de folículos atrésicos tanto de PRO ($F_{(3,6)} = 2,1$; $p = 0,2$) como de EPP ($F_{(3,6)} = 3,1$; $p = 0,1$) no difirió entre las clases.

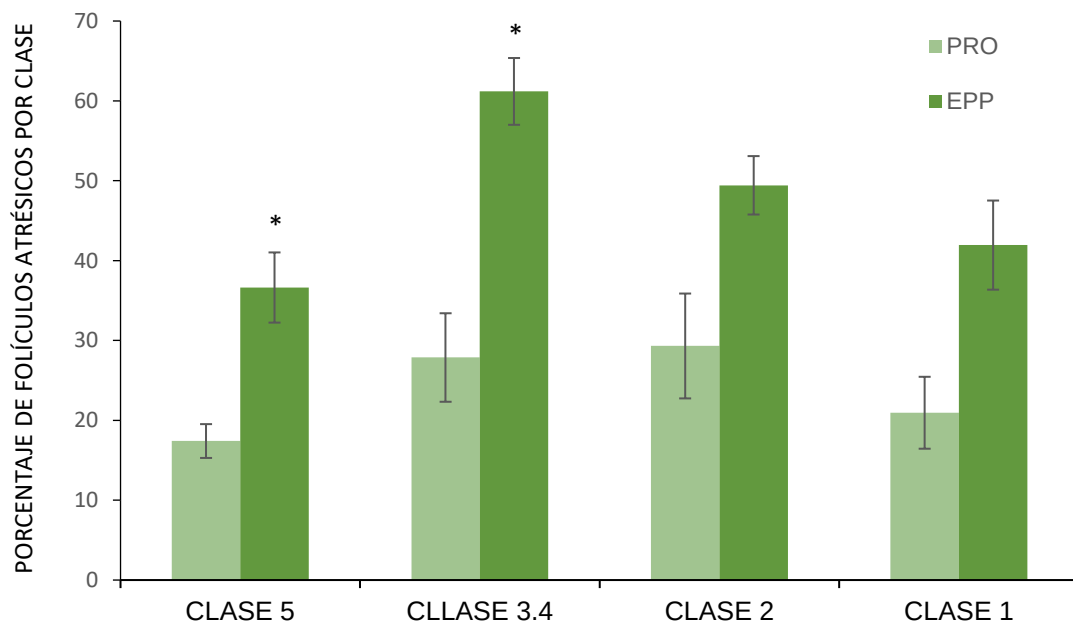


FIGURA 9. Porcentaje de folículos atrésicos dentro de cada clase de ovarios de hembras en proestro (PRO, $n=3$) y en estro posparto (EPP, $n=3$). Los datos se expresan como medias $\pm$ error estándar. *: $p \leq 0,05$, prueba t de Student. $p = \text{NS}$ entre clases dentro de un estado, ANOVA de medidas repetidas.

Como se muestra en la figura 10, las hembras en EPP presentaron un número mayor de folículos preovulatorios con atresia tipo II en comparación con PRO (clase 5: $t_{(4)} = -2,69$, $p = 0,055$), sin embargo no difirieron en el número de folículos no atrésicos ($t_{(4)} = -0,5$, $p = 0,64$). Este resultado se acompaña de una tendencia a presentar un incremento en el número total de folículos clase 5 en las hembras EPP en relación a las PRO (clase 5: $t_{(4)} = -2,38$, $p = 0,08$).

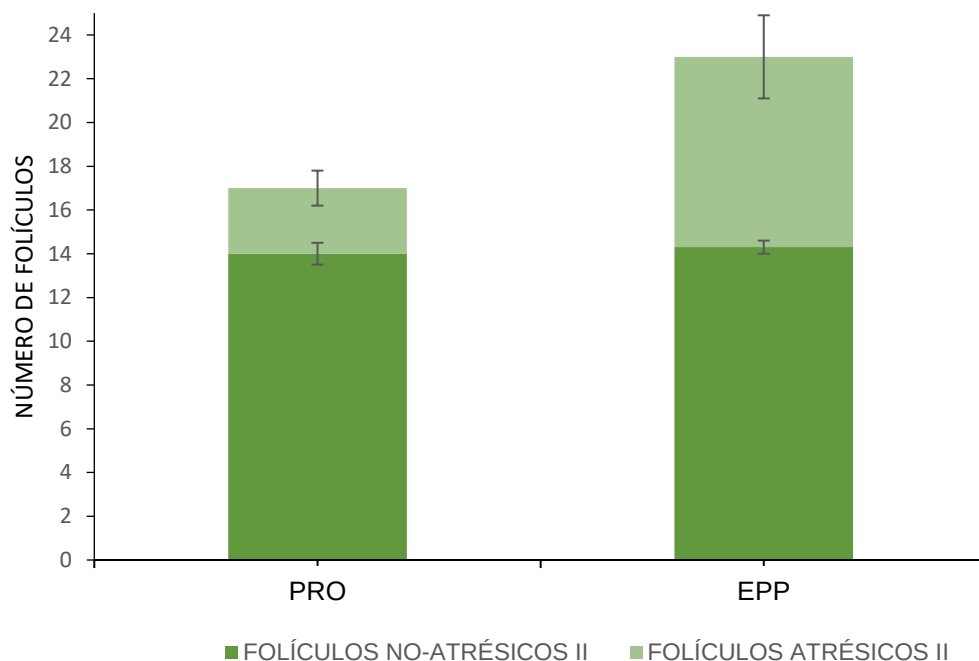


FIGURA 10. Número de folículos con atresia II y sin atresia II dentro de la clase 5 de ovarios de hembras en proestro (PRO, $n=3$) y en estro posparto (EPP, $n=3$). Los datos se expresan como medias $\pm$ error estándar.

La figura 11 muestra folículos con grado de atresia II de hembras PRO y EPP, con características típicas de este proceso, como fragmentación de la capa granulosa, vacuolización del antro, presencia de macrófagos o reinicio de la meiosis.

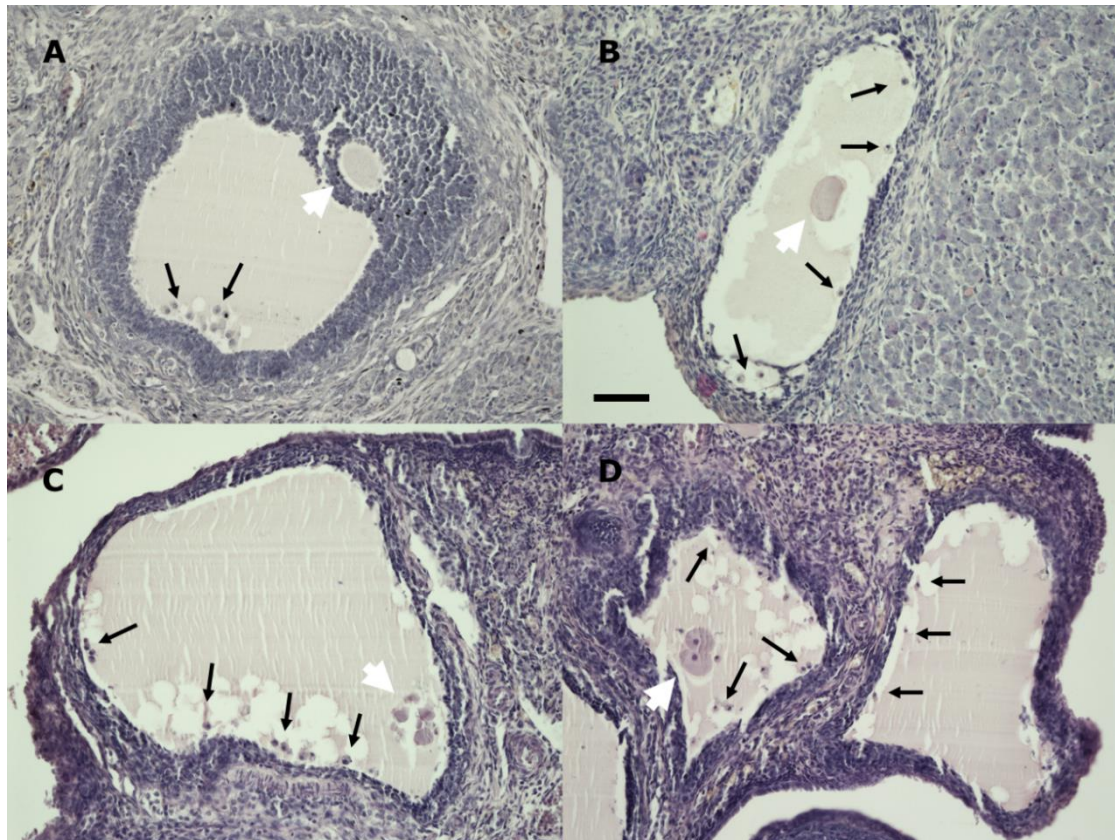


FIGURA 11. Folículos atrésicos clase II (de acuerdo a P. Osman, 1985). Folículos atrésicos de hembras PRO (A y B) y folículos atrésicos de hembras EPP (C y D). Las flechas negras señalan macrófagos y las flechas blancas señalan ovocitos. Barra representa 60 μ m.

Desarrollo luteal

El desarrollo luteal difirió entre PRO y EPP. El primer estado mostró una mayor cantidad de cuerpos lúteos, pero de menor tamaño (tabla 3, número: $t_{(4)} = 2,97$, $p = 0,04$ y tamaño: $t_{(4)} = -3,52$, $p = 0,02$). En este sentido, mientras que aproximadamente el 50% de los cuerpos lúteos de EPP superaron los 1000 μ m de tamaño ($49,5 \pm 6,6$), menos del 20% de los de PRO alcanzaron este tamaño ($16,6 \pm 2,1$) ($t_{(4)} = -3,76$; $p = 0,02$).

Si bien no se cuantificó el grado de atresia de los cuerpos lúteos, cualitativamente observamos un mayor grado de atresia en los cuerpos lúteos de las hembras PRO en relación a las hembras EPP, como se ejemplifica en la figura 12.

TABLA 3. Características de los cuerpos lúteos de ovarios PRO y EPP

	NÚMERO	TAMAÑO	TAMAÑO MÁXIMO
PRO	82,3 ± 11,8	731,2 ± 11,3	1169,3 ± 30,1
EPP	35,7 ± 5,0 *	1100,9 ± 84,9 *	1787,7 ± 46,3 **

PRO: proestro (n=3) y EPP: estro posparto (n=3). Los datos se expresan como medias ± error estándar. *: $p \leq 0,05$ y **: $p < 0,01$, Prueba t de Student.

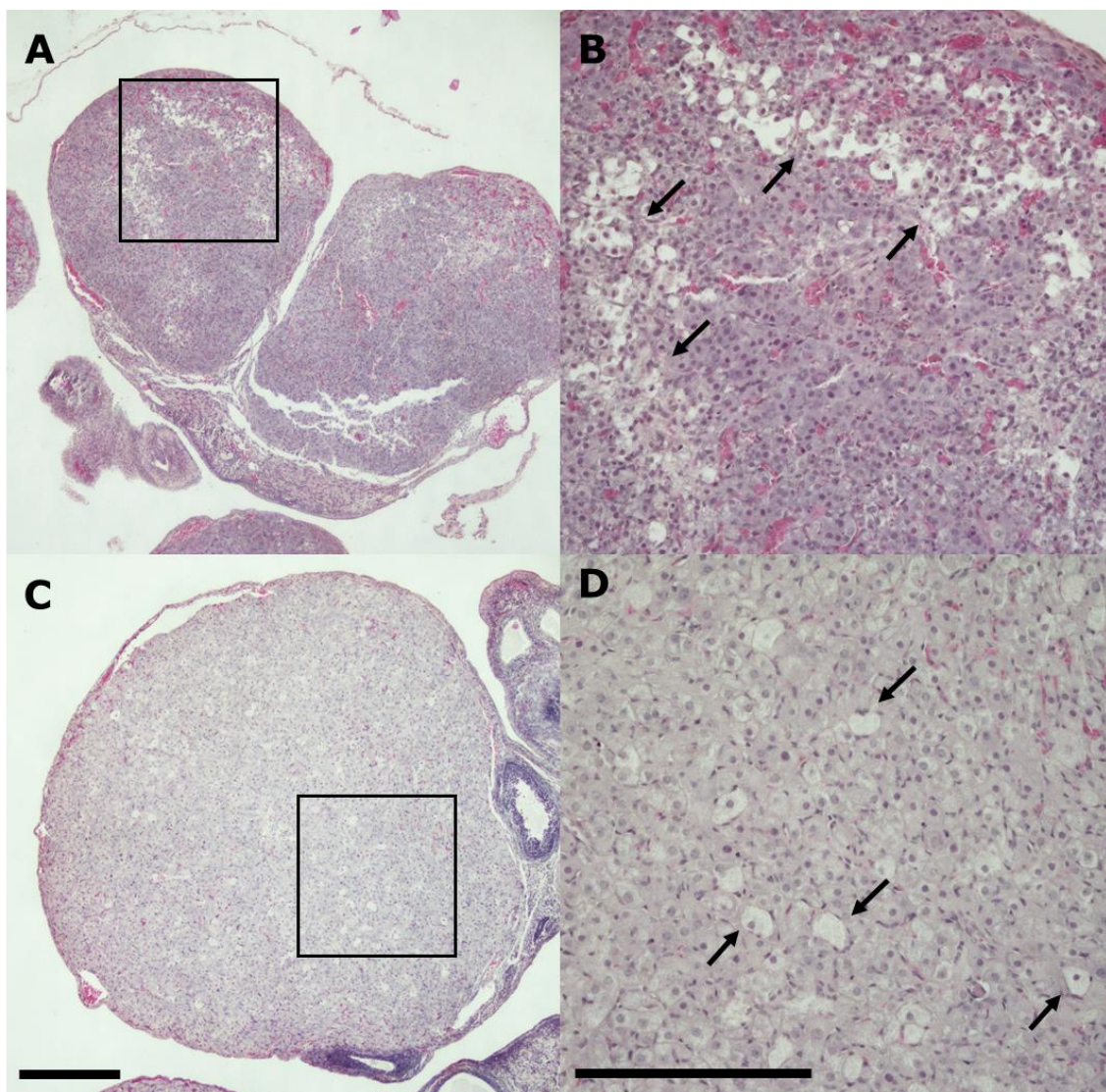


FIGURA 12. Cuerpos lúteos de hembras PRO (paneles A y B) y de hembras EPP (paneles C y D). La barra representa 300 μm en A y C y 40 μm en B y D. Las flechas señalan áreas de degeneración, las áreas señaladas en fotos A y C se muestran en B y D.

DISCUSIÓN

A partir del análisis histológico de los ovarios de hembras sexualmente activas en proestro (PRO) y estro posparto (EPP), no encontramos diferencias en el número y tamaño de folículos ováricos pre-ovulatorios ni detectamos ovulación. Sin embargo, los folículos de mayor tamaño de EPP presentaron menor grosor de la capa granulosa y un número mayor de los mismos eran atrésicos en comparación con lo observado en PRO. Con respecto al desarrollo luteal, las hembras EPP presentaron un menor número de cuerpos lúteos, pero de mayor tamaño y menor grado de regresión que las hembras PRO.

Ovulación

La ausencia de óvulos-*cumulus* en los oviductos, así como de ruptura de la capa granulosa y teca en los folículos de mayor tamaño tanto en las hembras EPP como las PRO indica que ninguna de las hembras analizadas ovuló. Este resultado era esperable en las hembras PRO, ya que numerosos trabajos muestran que las mismas no ovulan hasta la mañana del estro (Knobil & Neill, 2006). Sin embargo, era esperable detectar ovulación en hembras en EPP debido a que se ha reportado que el pico de LH (determinante de la ovulación) ocurre antes en el EPP que en el PRO (Hoffmann & Schwartz, 1965) y que varios trabajos observan ovulación antes de las 12 hs posparto (Hashizume et al., 1973b; Connor & Davis, 1980b). En este sentido, Connor & Davis, 1980b reportaron que más del 80% de las hembras habían ovulado a las 9 hs, mientras que Hashizume et al., 1973b, observaron que más de 50% de las hembras ovuló a las 12 hs. Si bien estos trabajos apuntan a una ovulación más temprana durante el EPP, nuestro resultado concuerda con otros estudios que observan que la ovulación durante este período puede darse entre 15 y 18 hs luego del parto (Ying et al., 1973; Takiguchi et al., 2004). La gran variabilidad observada en la hora de ovulación durante el EPP (Hashizume et al., 1973b; Ying et al., 1973; Connor & Davis, 1980b; Takiguchi et al., 2004 y esta tesina) podría estar relacionada a que el control de la ovulación durante este período reproductivo

dependería de más factores que durante el ciclo ovárico. En este sentido, como ya se mencionó, la expresión de comportamiento sexual y la ovulación luego del parto, posee una relación temporal con la hora de inicio de parto, pero también con el fotoperíodo (Blandau & Soderwall, 1941). Por otra parte, otros factores como la cepa de ratas, alimentación u otras condiciones particulares del laboratorio podrían influir este evento.

Desarrollo folicular

El hecho de que no halláramos diferencias en el número de folículos en las diferentes clases o en sus tamaños entre hembras en EPP y en PRO, indicaría que no existen cambios drásticos en el proceso de maduración de los folículos entre ambos estados reproductivos.

En este sentido, el tamaño medio de los folículos preovulatorios observados en este trabajo (en el entorno de las 700 μm) es congruente con los rangos de tamaños reportados por otros autores para la fase de proestro tardío (Boling et al., 1941; Hirshfield & Rees Midgley, 1978; Osman, 1975, 1985; Gaytán et al., 1996; Yoshida et al., 2009) y para el estro posparto, aunque estos estudios son previos al *heat* sexual (Greenwald, 1966; Taya & Sasamoto, 1981). Este tamaño medio de folículo preovulatorio clase 5 sugiere que la ovulación ocurriría, tanto en las hembras PRO como en las EPP, algunas horas luego del *heat* sexual, ya que el tamaño del folículo al momento de la ovulación sería de aproximadamente de 900 μm (Parkes & Evans, 1931; Boling et al., 1941; Deane, 1952). Por lo tanto, este resultado junto con la ausencia de ovulación sugiere que no existe un desfase significativo en el desarrollo folicular durante el *heat* sexual entre hembras en ambos estados reproductivos.

Por otra parte, si bien el tamaño de los folículos en desarrollo no varió entre ambos estados fisiológicos, detectamos un mayor número de folículos atrésicos y un grosor de la capa granulosa menor en EPP que en PRO.

Este incremento en el proceso de atresia avanzada de folículos mayores a 400 μm en las hembras EPP sugiere que factores relacionados con la

gestación y/o al parto promueven la atresia folicular. Éste, parecería ser un efecto generalizado del estado fisiológico sobre los folículos, ya que si bien fue más marcado en folículos de las clases 3-4 y 5, la atresia tendió a diferir entre los folículos de las clases 1 y 2 entre EPP y PRO. En este sentido, el control de la atresia folicular es complejo e implica el balance de factores intra- y extra-ováricos que promueven o disminuyen la sobrevivencia de los folículos ya que la ausencia de las mismos induce atresia folicular (Hsueh et al., 1994). La gestación y el parto son eventos reproductivos con cambios hormonales drásticos que controlan el desarrollo folicular (Woodruff et al., 1991). En este sentido, los folículos se encuentran expuestos a altas concentraciones de prolactina durante la primera mitad de la gestación, seguido por un aumento en los niveles de lactógenos placentarios hasta la fase final de la preñez (Knobil & Neill, 2006). Besnard et al., (2001), encontraron que la prolactina aumenta el número de folículos atrésicos en ovarios en proestro. Por lo que los altos niveles de lactógeno placentario previo al parto, como de prolactina luego del mismo, podrían promover la atresia en los folículos de estas hembras. Por otro lado, los folículos también se encuentran expuestos a elevados niveles de progesterona durante la gestación, que decaen previos al parto (Richards & Kersey, 1979). Existe evidencia que muestra que esta hormona previene la apoptosis en el endometrio (Hsueh et al., 1994). Finalmente, se ha reportado que en el parto los niveles de prostaglandinas y corticosterona aumentan (Knobil & Neill, 2006). La corticosterona es un glucocorticoide que se ha asociado a apoptosis en otros tejidos como el timo (Hsueh et al., 1994), y a su vez la $\text{PGF}_2\alpha$ (prostaglandina $\text{F}_2\alpha$) regula la activación de varios miembros de la familia de las caspasas en los cuerpos lúteos de ratas (Peluffo et al., 2007). La amplia variación en los niveles de estas hormonas, así como de otras, podrían mediar el incremento del fenómeno de atresia folicular luego del parto. Dilucidar si la exposición a estas hormonas durante el ciclo ovárico, es decir fuera del estado fisiológico particular del EPP, impacta el desarrollo y la atresia folicular, contribuiría al esclarecimiento de esta interrogante.

Si bien un aumento de la atresia en folículos de clase preovulatorios podría resultar en una menor ovulación, ya que los folículos atrésicos no son ovulados (Hsueh et al., 1994), no creemos que este sea el caso. Como se

muestra en los resultados, consideramos que un potencial efecto de la atresia de folículos clase 5 sobre la ovulación podría estar contrarrestado por la tendencia al aumento del número de folículos mayores a 575 μm en las hembras EPP en relación a las PRO. Apoyando esta idea, el número de folículos clase 5 “sanos”, en los cuales no se detectó atresia avanzada, no difirió entre ambos estados reproductivos.

En relación al menor grosor de la capa granulosa de los folículos mayores a 400 μm en las hembras EPP, no consideramos que este resultado se encuentre relacionado a la mayor atresia folicular detectada en este grupo, ya que esta diferencia se mantuvo al comparar los folículos “sanos” entre ambos estados fisiológicos. El menor grosor de la capa granulosa de los folículos preovulatorios de EPP, podría estar relacionado a un mayor avance de los mismos en su grado de maduración. En este sentido, Gaytán y colaboradores (1996) observaron que la proliferación de las células de la capa granulosa disminuye en los folículos mayores a 450 μm . Si bien no encontramos diferencias en el tamaño de los folículos preovulatorios entre ambos estados fisiológicos, el pico de LH en las hembras EPP se manifiesta antes y dura más que en las hembras PRO (Hoffmann & Schwartz, 1965), y dado que esta hormona detiene el crecimiento de la capa granulosa (Rao et al., 1978), es posible suponer que variaciones en la secreción de esta gonadotrofina expliquen las diferencias encontradas en el desarrollo folicular entre el EPP y el PRO. Sería interesante caracterizar el desarrollo folicular en ambos estados fisiológicos en otros puntos temporales más cercanos a la ovulación, con el fin de detectar posibles diferencias en el grado de maduración.

Cuerpos lúteos

Las diferencias en el desarrollo luteal entre las hembras de ambos grupos eran de esperar en base a la sobriedad estructural y funcional que presentan los cuerpos lúteos durante la gestación. Así, al igual que Bruce et al., (1984), encontramos que las hembras EPP presentan cuerpos lúteos de gran tamaño (con un tamaño máximo de 1787,7 μm) con características estereoidogénicas. Dicho autor sugiere que el aumento de volumen de éstos se debe al mayor

desarrollo vascular y a que sus células presentan características típicas de tejido esteroideogénico. Por otra parte, el tamaño máximo encontrado en este trabajo de los cuerpos lúteos de las hembras en PRO es similar a los encontrados en otros trabajos. En este sentido, se han reportado diámetros máximos de 1057,4 μm (Boling, 1942) y 1146,9 μm (Deane, 1952).

En el mayor tamaño de los cuerpos lúteos del EPP en relación a los de PRO probablemente subyace la diferencia de peso de los ovarios que encontramos en este trabajo. En este sentido, Greenwald (1966), reportó un aumento del peso de los ovarios durante la gestación, y lo relacionó al crecimiento de los cuerpos lúteos. A su vez, Bruce et al., (2001), indican que los cuerpos lúteos de tres o más ciclos, presentes en hembras cíclicas muestran una reducción en la masa del tejido.

Si bien no se cuantificó el grado de luteólisis, cualitativamente observamos una mayor regresión en los cuerpos lúteos de las hembras en PRO en relación a los de las hembras EPP. Esto era esperable ya que los cuerpos lúteos de las hembras PRO son provenientes de ciclos anteriores, todos estos en regresión (Long, 1973; Westwood, 2008; Yoshida et al., 2009; Sato et al., 2014; Gaytán et al., 2017). Además, los cuerpos lúteos presentes durante la gestación no se someten a luteólisis estructural rápida (Carrillo-Martínez et al., 2011). Según Bruce et al., (2001), la apoptosis es evidente en la gestación, aunque a tasas bajas. A pesar de las evidencias de apoptosis, el autor indica que las características histológicas y vasculares de los cuerpos lúteos se ajustan a la descripción de tejido esteroideogénico durante toda la gestación.

Es interesante destacar que, si bien no se observa una regresión estructural evidente de los cuerpos lúteos durante la gestación, sí ocurre una regresión funcional entre los días 19 de la gestación y el día del parto que conduce a una disminución precipitada de las concentraciones de progesterona (Richards & Kersey, 1979). En esta línea, Takiguchi y colaboradores (2004) detectaron la presencia de células apoptóticas en los cuerpos lúteos a partir del día 21 de preñez. Sin embargo, Bruce y colaboradores (2001) reportan que la

degeneración del cuerpo lúteo disminuye el día de parto, volviendo a aumentar al día siguiente. Debido a la evidencia contradictoria acerca de cómo ocurre la regresión estructural y funcional de los cuerpos lúteos durante el parto, sería interesante cuantificar apoptosis, utilizando la técnica de TUNEL para identificar muerte celular (Boone et al., 1997; Peluffo et al., 2007; Kurusu et al., 2009; Sato et al., 2014) o realizar una inmunohistoquímica para detectar caspasa-3 (Boone & Tsang, 1998; Peluffo et al., 2007) en los cuerpos lúteos de las hembras EPP durante el *heat* sexual.

En resumen, este trabajo, que consistió en el análisis histológico comparativo de los ovarios de ratas en proestro y estro posparto que expresan máxima actividad sexual, indica que existen diferencias en el desarrollo folicular durante estos dos estados fisiológicos. Este resultado sumado a la escasa información existente referente al desarrollo folicular durante el estro posparto, dan cuenta de la necesidad de más estudios en esta área que permitan conocer los factores que regulan la maduración folicular y la ovulación durante este período reproductivo particular.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrati, D. (2009). *Cambios en la respuesta a estímulos aversivos y atractivos durante la maternidad en la rata*. Universidad de la República, Montevideo.
- Bassett, D. L. (1943). The changes in the vascular pattern of the ovary of the albino rat during the estrous cycle. *American Journal of Anatomy*, 73(2), 251-291. <https://doi.org/10.1002/aja.1000730206>
- Beach, F. A. (1976). Sexual attractivity, proceptivity, and receptivity in female mammals. *Hormones and Behavior*, 7(1), 105-138. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(76\)90008-8](https://doi.org/10.1016/0018-506X(76)90008-8)
- Beach, F. A., Etkin, W., & Rasquin, P. (1942). Importance of progesterone to induction of sexual receptivity in spayed female rats. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 51(3), 369-371. <https://doi.org/10.3181/00379727-51-13979>
- Besnard, N., Horne, E. a. L., & Whitehead, S. A. (2001). Prolactin and lipopolysaccharide treatment increased apoptosis and atresia in rat ovarian follicles. *Acta Physiologica Scandinavica*, 172(1), 17-25. <https://doi.org/10.1046/j.1365-201X.2001.00813.x>
- Blandau, R. J., & Soderwall, A. L. (1941). Post-parturitional heat and the time of ovulation in the albino rat. Data on parturition. *The Anatomical Record*, 81(4), 419-431. <https://doi.org/10.1002/ar.1090810402>
- Boling, J. L. (1942). Growth and regression of corpora lutea during the normal estrous cycle of the rat. *The Anatomical Record*, 82(2), 131-145. <https://doi.org/10.1002/ar.1090820202>
- Boling, J. L., & Blandau, R. J. (1939). Theestrogen-progesteroneinduction of mating responses in the spayed female rat. *Endocrinology*, 25(3), 359-364. <https://doi.org/10.1210/endo-25-3-359>
- Boling, J. L., Blandau, R. J., Soderwall, A. L., & Young, W. C. (1941). Growth of the graafian follicle and the time of ovulation in the albino rat. *The Anatomical Record*, 79(3), 313-331. <https://doi.org/10.1002/ar.1090790305>

- Boone, D. L., Carnegie, J. A., Rippstein, P. U., & Tsang, B. K. (1997). Induction of apoptosis in equine chorionic gonadotropin (eCG)-primed rat ovaries by anti-eCG antibody. *Biology of Reproduction*, 57(2), 420-427. <https://doi.org/10.1095/biolreprod57.2.420>
- Boone, D. L., & Tsang, B. K. (1998). Caspase-3 in the rat ovary: Localization and possible role in follicular atresia and luteal regression. *Biology of Reproduction*, 58(6), 1533-1539. <https://doi.org/10.1095/biolreprod58.6.1533>
- Bruce, N. W., Hisheh, S., & Dharmarajan, A. M. (2001). Patterns of apoptosis in the corpora lutea of the rat during the oestrous cycle, pregnancy and in vitro culture. *Reproduction, Fertility and Development*, 13(3), 105-109. <https://doi.org/10.1071/rd01011>
- Bruce, N. W., Meyer, G. T., & Dharmarajan, A. M. (1984). Rate of blood flow and growth of the corpora lutea of pregnancy and of previous cycles throughout pregnancy in the rat. *Reproduction*, 71(2), 445-452. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0710445>
- Carrillo-Martínez, G. E., Gómora-Arrati, P., González-Arenas, A., Morimoto, S., Camacho-Arroyo, I., & González-Flores, O. (2011). Role of progesterone receptors during postpartum estrus in rats. *Hormones and Behavior*, 59(1), 37-43. <https://doi.org/10.1016/j.yhbeh.2010.10.008>
- Connor, J. R., & Davis, H. N. (1980a). Postpartum estrus in Norway rats. I. Behavior. *Biology of Reproduction*, 23(5), 994-999. <https://doi.org/10.1095/biolreprod23.5.994>
- Connor, J. R., & Davis, H. N. (1980b). Postpartum estrus in Norway rats. II. Physiology. *Biology of Reproduction*, 23(5), 1000-1006. <https://doi.org/10.1095/biolreprod23.5.1000>
- Davidson, J. M., Rodgers, C. H., Smith, E. R., & Bloch, G. J. B. (1968). Stimulation of female sex behavior in adrenalectomized rats with estrogen alone. *Endocrinology*, 82(1), 193-195. <https://doi.org/10.1210/endo-82-1-193>
- Deane, H. W. (1952). Histochemical observations on the ovary and oviduct of the albino rat during the estrous cycle. *American Journal of Anatomy*, 91(3), 363-413. <https://doi.org/10.1002/aja.1000910303>

- Escobar, M. L., Echeverría, O. M., & Vázquez-Nin, G. H. (2013). Role of autophagy in the ovary cell death in mammals. *Autophagy - A Double-Edged Sword - Cell Survival or Death?* (pp. 423-441). Recuperado de <https://www.intechopen.com/books/autophagy-a-double-edged-sword-cell-survival-or-death-role-of-autophagy-in-the-ovary-cell-death-in-mammals>
- Gaytán, F., Bellido, C., Morales, C., & Sánchez-Criado, J. E. (1998). Both prolactin and progesterone in proestrus are necessary for the induction of apoptosis in the regressing corpus luteum of the rat. *Biology of Reproduction*, 59(5), 1200-1206. <https://doi.org/10.1095/biolreprod59.5.1200>
- Gaytán, F., Morales, C., Bellido, C., Aguilar, E., & Sánchez-Criado, J. E. (1996). Proliferative activity in the different ovarian compartments in cycling rats estimated by the 5-bromodeoxyuridine technique. *Biology of Reproduction*, 54(6), 1356-1365. <https://doi.org/10.1095/biolreprod54.6.1356>
- Gaytán, F., Morales, C., León, S., Heras, V., Barroso, A., Avendaño, M. S., Vázquez, M. J., Castellano, J. M., Roa, J., Tena-Sempere, M. (2017). Development and validation of a method for precise dating of female puberty in laboratory rodents: The puberty ovarian maturation score (Pub-Score). *Scientific Reports*, 7, 46381. <https://doi.org/10.1038/srep46381>
- Gilbert, A. N., Pelchat, R. J., & Adler, N. T. (1980). Postpartum copulatory and maternal behaviour in Norway rats under seminatural conditions. *Animal Behaviour*, 28(4), 989-995. [https://doi.org/10.1016/S0003-3472\(80\)80087-X](https://doi.org/10.1016/S0003-3472(80)80087-X)
- Greenwald, G. S. (1966). Ovarian follicular development and pituitary FSH and LH content in the pregnant rat. *Endocrinology*, 79(3), 572-578. <https://doi.org/10.1210/endo-79-3-572>
- Hardy, D. F. (1972). Sexual behavior in continuously cycling rats. *Behaviour*, 41(3-4), 288-297. <https://doi.org/10.1163/156853972X00068>
- Hashizume, K., Sugawara, S., & Takeuchi, S. (1973a). Studies on the reproductive phenomena in parturient rat II. Ovulating hormone release in the parturient ovulation in rat. *Tohoku Journal of Agricultural Research*, 24(3), 123-127.

- Hashizume, K., Sugawara, S., & Takeuchi, S. (1973b). Studies on the reproductive phenomena in the post-partum rat I. Time of delivery and post-partum ovulation in rat. *Tohoku journal of agricultural research*, 24(3), 117–122.
- Hirshfield, A. N., & Rees Midgley, A. (1978). Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction*, 19(3), 597-605. <https://doi.org/10.1095/biolreprod19.3.597>
- Hoffmann, J. C. (1968). Effect of photoperiod on estrous cycle length in the rat. *Endocrinology*, 83(6), 1355-1357. <https://doi.org/10.1210/endo-83-6-1355>
- Hoffmann, J. C. (1969). Light and Reproduction in the rat: Effect of lighting schedule on ovulation blockade. *Biology of Reproduction*, 1(2), 185-188. <https://doi.org/10.1095/biolreprod1.2.185>
- Hoffmann, J. C., & Schwartz, N. B. (1965). Timing of post-partum ovulation in the Rat. *Endocrinology*, 76(4), 620-625. <https://doi.org/10.1210/endo-76-4-620>
- Hsueh, A. J. W., Billig, H., & Tsafiriri, A. (1994). Ovarian follicle atresia: A hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, 15(6), 707-724. <https://doi.org/10.1210/edrv-15-6-707>
- Knobil, E., & Neill, J. (2006). *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (The 3rd edition, Vol. 2). Gulf Professional Publishing.
- Kuehn, R. E., & Beach, F. A. (1963). Quantitative measurement of sexual receptivity in female rats 1). *Behaviour*, 21(3-4), 282-299. <https://doi.org/10.1163/156853963X00202>
- Kurusu, S., Suzuki, K., Taniguchi, K., Yonezawa, T., & Kawaminami, M. (2009). Structural regression of the rat corpus luteum of pregnancy: Relationship with functional regression, apoptotic cell death, and the suckling stimulus. *Zoological Science*, 26(10), 729-734. <https://doi.org/10.2108/zsj.26.729>
- Long, J. A. (1973). Corpus luteum of pregnancy in the rat—Ultrastructural and cytochemical observations. *Biology of Reproduction*, 8(1), 87-99. <https://doi.org/10.1093/biolreprod/8.1.87>
- Osman, P. (1975). Preovulatory changes in the ovaries during the first spontaneous pro-oestrus in the rat. *Journal of Endocrinology*, 67(2), 259-265. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0670259>

- Osman, P. (1985). Rate and course of atresia during follicular development in the adult cyclic rat. *Reproduction*, 73(1), 261-270. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0730261>
- Parkes A. S., & Evans C. A. L. (1931). The reproductive processes of certain mammals. II.—The size of the Graafian follicle at ovulation. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Containing Papers of a Biological Character*, 109(761), 185-196. <https://doi.org/10.1098/rspb.1931.0076>
- Peluffo, M. C., Stouffer, R. L., & Tesone, M. (2007). Activity and expression of different members of the caspase family in the rat corpus luteum during pregnancy and postpartum. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 293(5), E1215-E1223. <https://doi.org/10.1152/ajpendo.00261.2007>
- Pfaff, D. (1970a). Nature of sex hormone effects on rat sex behavior: Specificity of effects and individual patterns of response. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 73(3), 349-358. <https://doi.org/10.1037/h0030242>.
- Pfaff, D. F. (1970b). Mating behavior of hypophysectomized rats. *Journal of Comparative and Physiological Psychology*, 72(1), 45-50. <https://doi.org/10.1037/h0029312>.
- Pfaus, J. G., Smith, W. J., & Coopersmith, C. B. (1999). Appetitive and consummatory sexual behaviors of female rats in bilevel chambers: I. A correlational and factor analysis and the effects of ovarian hormones. *Hormones and Behavior*, 35(3), 224-240. <https://doi.org/10.1006/hbeh.1999.1516>
- Rao, M. C., Midgley, A. R., & Richards, J. S. (1978). Hormonal regulation of ovarian cellular proliferation. *Cell*, 14(1), 71-78. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(78\)90302-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(78)90302-1)
- Richards, J. S., & Kersey, K. A. (1979). Changes in theca and granulosa cell function in antral follicles developing during pregnancy in the rat: gonadotropin receptors, cyclic AMP and estradiol-17 β . *Biology of Reproduction*, 21(5), 1185-1201. <https://doi.org/10.1095/biolreprod21.5.1185>
- Sato, J., Hashimoto, S., Doi, T., Yamada, N., & Tsuchitani, M. (2014). Histological characteristics of the regression of corpora lutea in Wistar Hannover rats:

- The comparisons with Sprague-Dawley rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 27(2), 107-113. <https://doi.org/10.1293/tox.2013-0054>
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9, 671-675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Smith, M. S., Freeman, M. E., & Neill, J. D. (1975). The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat: Prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*, 96(1), 219-226. <https://doi.org/10.1210/endo-96-1-219>
- Snoeren, E. M. S., Veening, J. G., Olivier, B., & Oosting, R. S. (2014). Serotonin 1A receptors and sexual behavior in female rats: A review. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 121, 43-52. <https://doi.org/10.1016/j.pbb.2013.11.017>
- Södersten, P. (1985). Estradiol-progesterone interactions in the reproductive behavior of female rats. En D. Ganten & D. Pfaff (Eds.), *Actions of Progesterone on the Brain* (pp. 141-174). https://doi.org/10.1007/978-3-642-69728-9_5
- Södersten, P., & Eneroth, P. (1981). Serum levels of oestradiol-17 β and progesterone in relation to sexual receptivity in intact and ovariectomized rats. *Journal of Endocrinology*, 89(1), 45-54. <https://doi.org/10.1677/joe.0.0890045>
- Szoltys, M. (1976). Progestagen dynamics in preovulatory follicles of rats. *Reproduction*, 48(2), 397-398. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0480397>
- Takiguchi, S., Sugino, N., Esato, K., Karube-Harada, A., Sakata, A., Nakamura, Y., Ishikawa, H., Kato, H. (2004). Differential regulation of apoptosis in the corpus luteum of pregnancy and newly formed corpus luteum after parturition in rats. *Biology of Reproduction*, 70(2), 313-318. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018853>
- Taya, K., & Sasamoto, S. (1981). Changes in FSH, LH and prolactin secretion and ovarian follicular development during lactation in the rat. *Endocrinologia Japonica*, 28(2), 187-196. <https://doi.org/10.1507/endocrj1954.28.187>

- Tennent, B. J., Smith, E. R., & Davidson, J. M. (1980). The effects of estrogen and progesterone on female rat proceptive behavior. *Hormones and Behavior*, 14(1), 65-75. [https://doi.org/10.1016/0018-506X\(80\)90016-1](https://doi.org/10.1016/0018-506X(80)90016-1)
- Westwood, F. R. (2008). The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology*, 36(3), 375-384. <https://doi.org/10.1177/0192623308315665>
- Woodruff, T. K., Ackland, J., Rahal, J. O., Schwartz, N. B., & Mayo, K. E. (1991). Expression of ovarian inhibin during pregnancy in the rat. *Endocrinology*, 128(3), 1647-1654. <https://doi.org/10.1210/endo-128-3-1647>
- Ying, S.-Y., Gove, S., Fang, V. S., & Greep, R. O. (1973). Ovulation in postpartum rats. *Endocrinology*, 92(1), 108-116. <https://doi.org/10.1210/endo-92-1-108>
- Yoshida, M., Sanbuisso, A., Hisada, S., Takahashi, M., Ohno, Y., & Nishikawa, A. (2009). Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *The Journal of Toxicological Sciences*, 34, 189-197. <https://doi.org/10.2131/jts.34.S189>