

EFECTO DE LOS AMINOÁCIDOS EXCITADORES SOBRE EL INICIO DE LA PUBERTAD EN CABRAS: CUANTIFICACIÓN DE PROGESTERONA COMO MARCADOR ENDOCRINO DE PUBERTAD

EXCITATORY AMINO ACID EFFECTS UPON THE ONSET OF PUBERTY IN GOATS: QUANTIFICATION OF PROGESTERONA AS ENDOCRINE MARKER OF PUBERTY

C. A. Meza Herrera, J. I. López Medrano, M. Torres Moreno, K. Tinajero Pérez, M. Mellado Bosque y A. Gonzalez de Bulnes

Universidad Autónoma Chapingo. Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas.
Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.
Departamento de Reproducción Animal. INIA-Madrid, España.

RESUMEN. Glutamato, el principal aminoácido neuroexcitador del sistema nervioso central ha demostrado desempeñar un papel importante en la regulación de la secreción de gonadotropinas en mamíferos. En efecto, la presencia de una pubertad precoz en respuesta a la administración de agonistas de glutamato ha sido reportada en varias especies. El objetivo del presente fue evaluar el efecto de la suplementación de aminoácidos excitadores sobre el inicio de la pubertad en cabritas prepúberes, durante un período de 112 días (Junio – Septiembre) en la Comarca Lagunera. El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Caprina Sur, URUZA-UACH (26° LN, 103° LO, a 1,1 17 msnm). Cabras prepúberes (n=20), con un peso vivo promedio de 16 kg, 5 meses de edad, y un encaste de 7/8 Saanen y Alpina, recibieron una dieta para cubrir 120% de sus requerimientos nutricionales ajustados al PV. Tanto el PV como la condición corporal (CC) fueron registradas cada 15 días previo a su alimentación. En Junio, las cabras fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos experimentales: 1). Aminoácidos excitadores (AA, n=10; 16.52±1.04 kg, 3.4±0.12 CC) y Control, (CC, n=10; 16.1±1.04 kg y 3.1±0.12 CC). El grupo AA recibió una infusión endovenosa, 7 mg kg⁻¹ PV de L-glutamato, mientras que el grupo CC recibió una inyección de solución salina. A mediados de Junio y hasta finales de Septiembre, se realizó un muestreo intermitente de sangre (1 vez por semana) del total de las cabritas en estudio (n=20). Las muestras de suero fueron evaluadas por duplicado por su contenido de P₄, mediante radioinmunoanálisis. Cabritas con dos muestras consecutivas de suero con niveles séricos de P₄ eⁿ 1 ng mL⁻¹ fueron clasificadas reproductivamente activas considerando en dicho momento el inicio de la pubertad. Los PV y la CC fueron evaluados mediante un ANOVA-DCA. El porcentaje de cabritas mostrando o no actividad ovárica considerará un análisis de Xi². Se observó un inicio mas temprano (P<0.05) así como un mayor porcentaje de cabritas mostrando actividad ovárica (P<0.05) en el grupo suplementado con L-glutamato, con un 70% de las cabritas mostrando actividad ovárica durante los 112 días que consideró el período experimental. Mientras que los promedios iniciales para PV y CC fueron 16.65±1.04 kg, y 3.31±0.12 unidades, no existiendo diferencias (P>0.05) entre grupos experimentales, no se observaron diferencias (P>0.05) entre los grupos experimentales para las citadas variables a lo largo del período experimental.

Palabras Clave: Cabras, pubertad, glutamato, actividad ovárica.

SUMMARY. Glutamate, the main neuroexcitatory amino acid of the central nervous system has displayed a paramount role in the modulation of gonadotropin secretion in mammals. In fact, occurrence of a precocious puberty in response to the agonists to glutamate has been reported in several species. The aim of this work was to evaluate the effect of excitatory amino acid supplementation upon the onset of puberty in prepuberal young goats during a 112 days period (June-September) in the Comarca Lagunera. The study was carried out in the Southern Goat Research Unit, URUZA-UACH (26° NL, 103° WL, at 1,1 17 m). Prepuberal goats (n=20), with an average live weight of 16 kg, 5 months old and 7/8 Saanen-Alpina, received a diet to cover 120% of their nutritional requirements adjusted to LW. Both LW and body condition (BC) were registered every 15 days prior feeding. In June, goats were randomly distributed to two experimental groups: 1). Excitatory amino acids (AA, n=10; 16.52±1.04 kg, 3.4±0.12 CC) and Control, (CC, n=10; 16.1±1.04 kg, 3.1±0.12 CC). The AA group received an intravenous infusion, 7 mg kg⁻¹ LW of L-glutamate, while the CC group received saline. At mid-June and up to late September, an intermittent blood sampling (1 per week) was performed. Blood samples were evaluated by their content of P₄, by radioimmunoanalysis. Goats with two consecutive serum samples with concentrations P₄ > 1 ng mL⁻¹ were classified as reproductively active considering that moment as the onset of puberty. Both LW and CC were evaluated by an ANOVA-CRD. Percentage of goats depicting or not ovarian activity considered a Xi² analysis. An earlier onset of puberty (P<0.05) as well as a greater percentage of goats depicting ovarian activity (P<0.05) were observed in the L-glutamate supplemented group during the 112 days of experimental period. While the initial averages for LW and CC were 16.65±1.04 kg, and 3.31±0.12 units, respectively, no differences (P>0.05) between experimental groups were observed for these variables along the experimental period.

Key Words: Goats, puberty, glutamate, ovarian activity.

INTRODUCCIÓN

La comunicación existente entre los sistemas neural y endocrino involucra el reconocer el rol que sobre la función cerebral ejercen los neurotransmisores glutamato y aspartato, también denominados aminoácidos excitadores (AAE) (Mahesh y Brann, 2005). Debido a su amplia distribución en las diferentes sinapsis del sistema nervioso central (SNC), tanto el glutamato como el aspartato han sido reconocidos como reguladores centrales de un creciente número de procesos fisiológicos en el organismo (Mahesh y Brann, 2005; Parent *et al.*, 2005; Roth *et al.*, 2006). En efecto, dichos AAE han sido localizados en una gran variedad de núcleos hipotalámicos que controlan la función reproductiva y neuroendocrina, y se ha sugerido que pueden ejercer un rol preponderante en el control procesos reproductivos tales como el inicio de la pubertad, el control de la pulsatilidad de GnRH, el pico preovulatorio de las gonadotropinas, además de participar en la respuesta a ciertas situaciones de estrés (Van der pol *et al.*, 1996; Zamorano *et al.*, 1998; Dhandapani y Brann, 2000).

Glutamato y aspartato, han sido reconocidos como mediadores primarios de la transmisión sináptica en el SNC, y han sido identificados, mediante sondas inmunoquimioluminiscencia, en las terminales axónicas presinápticas de la vasta mayoría de los núcleos hipotalámicos estando, por lo tanto, estratégicamente posicionados para controlar diferentes funciones hipotalámicas (Van der pol *et al.*, 1996; Mahesh y Brann, 2005; Parent *et al.*, 2005; Roth *et al.*, 2006). Sin embargo, los factores específicos que controlan la liberación de AAE por parte de las terminales sinápticas permanecen pobremente entendidos, sugiriéndose que hormonas esteroides ováricas afectan la tasa de secreción de dicho neurotransmisor a nivel hipotalámico.

Lo anterior puede proveer un mecanismo mediante el cual exista un control ovárico del pulso generador de LH y por consiguiente del eje GnRH-LH-Ovario-Ovulación. Según Ping *et al.* (1998), el tratamiento de E2 + P4 en hembras ovariectomizadas incrementó ($P < 0.01$) la tasa de liberación de ambos AAE en el área preóptica del hipotálamo. Dado que la tasa de secreción de glutamato se incrementó previo al pico preovulatorio, se ha sugerido que el incremento en la liberación de AAE en el área preóptica fue requerido previo a la activación de los neurones secretoras de GnRH. Se ha observado que los niveles de AAE se incrementan durante la inducción estrógeno dependiente del pico preovulatorio de LH, así como previo al inicio de la pubertad (Zapatero-Caballero *et al.*, 2004; Hughes y Humanan, 2006; Whitlock *et al.*, 2006).

En mamíferos, durante el período posnatal temprano, las concentraciones circulantes de LH son bajas. Posteriormente, entre las semanas 10 y 22 de edad se observa un momentáneo incremento en la concentración de LH, con una alta amplitud en su pulsatilidad y con aparente capacidad de lograr efectos estimulatorios sobre el desarrollo de folículos ováricos (Zapatero-Caballero *et al.*, 2004; Hughes y Humanan, 2006; Whitlock *et al.*, 2006). Durante los siguientes meses de vida la secreción de LH se torna limitada hasta que se observa un progresivo incremento en la frecuencia de los pulsos de LH, al igual que de FSH, los cuales anteceden la madurez sexual. Varios autores sugieren que un incremento en la secreción hipotalámica de GnRH es el principal factor responsable para que exista dicho incremento temprano en la secreción de gonadotropinas. El incremento en la secreción de gonadotropinas en el estado prepúberal puede establecerse debido a la remoción de algún efecto inhibitorio a nivel hipotalámico o en otros centros del sistema nervioso central (Zapatero-Caballero *et al.*, 2004; Hughes y Humanan, 2006; Whitlock *et al.*, 2006). Glutamato, el principal aminoácido neuroexcitador del sistema nervioso central ha demostrado desempeñar un papel importante en la regulación de gonadotropinas en especies como la murina, ovina, bovina y primates. En efecto, la presencia de una pubertad precoz en respuesta a la administración de agonistas de glutamato ha sido reportada en ratas y monos (Mahesh y Brann, 2005; Parent *et al.*, 2005; Roth *et al.*, 2006).

El objetivo del presente estudio plantea la evaluación del efecto de la suplementación de aminoácidos excitadores (AA) y control (CC) sobre el inicio de la pubertad mediante la cuantificación de la concentración sérica de progesterona como marcador endocrino del inicio de la actividad ovárica en cabritas prepúberes, durante un período de 112 días (Junio – Septiembre) en la Comarca Lagunera.

MATERIAL Y MÉTODOS

Localización del área experimental, condiciones ambientales, animales y alimentación. El estudio se realizó en la Unidad de Investigación Caprina Sur, de la Unidad Regional Universitaria de Zonas Áridas, Universidad Autónoma Chapingo (URUZA-UACH, 26° LN, 103° LO, a 1,117 msnm). El clima presente es del tipo cálido seco con oscilaciones térmicas extremas. Los promedios anuales de precipitación y temperatura fueron 217.1 mm y 22.3°C, respectivamente. Cabras prepúberes ($n=20$), con un peso aproximado de 16 kg, con 5 meses de edad, y un encaste mínimo de 7/8 Saanen y Alpina, recibieron una dieta para cubrir 120% de sus requerimientos nutricionales ajustados al PV

(NRC, 1985). Tanto el PV como la condición corporal (CC) fueron registradas cada 15 días previo a su alimentación. La CC fue evaluada mediante palpación dorsal y costal utilizando una escala de 1 (muy flaca) a 5 (muy gorda). Las cabras fueron alimentadas dos veces al día: por la mañana (0700) heno de alfalfa (14% PC, 1.14 ENm Mcal kg⁻¹) y ensilado de maíz (8.1% PC, 1.62 ENm Mcal kg⁻¹), y por la tarde (1800) maíz rolado (11.2% PC, 2.38 ENm Mcal kg⁻¹) bajo condiciones naturales de luz durante Junio a Septiembre.

Diseño de tratamientos. En Junio, las cabras fueron aleatoriamente distribuidas en dos grupos experimentales: 1). Aminoácidos excitadores (**AA**, n=10) y Control, (**CC**, n=10). El grupo AA recibió una infusión endovenosa, 7 mg kg⁻¹ PV de L-glutamina (C₅H₁₀N₂O₃, Merck, Germany) los lunes y viernes durante todo el período experimental. Por su parte, las cabritas del grupo CC recibió una aplicación endovenosa de agua destilada los lunes y viernes para homogenizar las condiciones a la que estuvieron expuestas las cabras del grupo AA. Las cabritas de los dos grupos experimentales tuvieron libre acceso a agua, sales minerales, y sombra.

Muestreo intermitente de sangre. A mediados de Junio y hasta finales de Septiembre, se realizó un muestreo intermitente de sangre (1 vez por semana) del total de las cabritas en estudio (n=20). Las muestras sanguíneas fueron colectadas mediante venopunción de la yugular utilizando agujas estériles de 0.8x38 mm (Becton Dickinson & Co., Franklin Lakes, USA) y tubos colectores Vacutainer de 10 mL (Corvac, Sherwood Medical, St Louis, MO, USA). Una vez centrifugadas las muestras (1,500 x g, 15 min), cada muestra de suero con su replica fueron almacenadas en tubos de polipropileno a -4°C. En total se colectaron 16 muestras por cabra; 160 (AA) y 160 (CC) muestras por tratamiento, para un total de 320 muestras originales de suero.

Cuantificación de progesterona en suero, criterios para evaluar la actividad reproductiva y análisis estadísticos. Las muestras de suero fueron evaluadas por duplicado por su contenido de P₄, mediante RIA (Diagnostic Products, Los Angeles, CA, USA). La prueba ha sido modificada y validada para su uso en suero de rumiantes (Schneider y Hallford, 1996). Los análisis endocrinos fueron realizados en el Departamento de Ciencia Animal de la Universidad Estatal de Nuevo México, E.U.A. Cabritas con dos muestras consecutivas de suero con niveles séricos de P₄ e³ 1 ng mL⁻¹ fueron clasificadas reproductivamente activas considerando en dicho momento el inicio de la pubertad (Cushwa et al., 1992). Los PV y la CC fueron evaluados mediante un ANOVA-DCA (Snedecor y Cochran, 1967).

El porcentaje de cabritas mostrando o no actividad ovárica considerará un análisis de Xi². Todos los análisis considerarán los procedimientos del paquete estadístico SAS (SAS, 1991).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En el Cuadro 1 se concentran las medias de mínimos cuadrados para peso vivo y condición corporal de junio a septiembre en cabritas pre-púberes suplementadas con aminoácidos excitadores (AA), y control (CC) bajo un fotoperíodo natural decreciente. Mientras que el peso vivo promedio al inicio del período experimental fue 16.65±1.04 kg, y la condición corporal promedió 3.31±0.12 unidades, durante todo el período experimental no se observaron diferencias (P>0.05) entre los grupos experimentales para las citadas variables.

En el Cuadro 2 se concentran las medias de mínimos cuadrados para porcentaje de cabritas mostrando actividad ovárica (Pubertad, %) durante el período experimental junio-septiembre, así como peso vivo (PV, kg) y condición corporal (CC, unidades) al inicio (Junio=1) y al final (Septiembre=4) del período experimental en cabritas peripúberes (n=20) suplementadas con aminoácidos excitadores (AA) y Control (CC) bajo un fotoperíodo natural en la Comarca Lagunera (25° LN).

El porcentaje de cabritas mostrando el inicio de la actividad reproductiva (pubertad) determinada por los niveles séricos de P₄, difirió (P<0.05) entre tratamientos observando un inicio más temprano en las cabritas-AA, de las cuales un 70% mostró actividad ovárica durante los 112 d que consideró el período experimental. Por su parte, ni el PV (P=0.69) ni la CC (P=0.38) difirieron entre tratamientos a lo largo del ciclo en evaluación. El cambio de un estado prepuberal a uno puberal considera marcados cambios en la función del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas.

La transición completa de un estado prepuberal a la maduración total de la pubertad será un prerrequisito indispensable para el establecimiento de la función reproductiva (Huffman *et al.*, 1987; Apter, 1997; Roth *et al.*, 2001; Apter y Hermanson, 2002; Teresawa, 2005; Clarkson y Herbison, 2006; Messinis, 2006; Ojeda *et al.*, 2006a). Previo a la pubertad, la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) está significativamente inactiva. Al inicio de la pubertad, el gonadostato hipotalámico está deprimido y la amplitud de los pulsos de GnRH se incrementa. Los niveles de las hormonas gonadotrópicas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) se incrementan gradualmente durante la pubertad estimulando la maduración de folículos y la producción de estrógenos en los ovarios (Huffman

Cuadro 1. Medias de mínimos cuadrados para peso vivo (PV, kg), y condición corporal (CC, unidades) durante Junio (1), Julio (2), Agosto (3) y Septiembre (4) en cabritas prepúberes (n=27) suplementadas con aminoácidos excitadores (AA) o Control (CC) bajo fotoperiodo natural en la Comarca Lagunera

Variables	AA	CC	NSO ¹	EE ²
PV1	16.52 ^a	16.13 ^a	0.69	1.04
CC1	3.40 ^a	3.17 ^a	0.38	0.12
PV2	19.92 ^a	19.86 ^a	0.94	1.12
CC2	3.13 ^a	3.06 ^a	0.89	0.11
PV3	20.94 ^a	20.33 ^a	0.77	0.87
CC3	3.07 ^a	2.93 ^a	0.30	0.11
PV4	23.72 ^a	22.79 ^a	0.45	0.80
CC4	3.65 ^a	3.43 ^a	0.40	0.11

¹ NSO, nivel de significancia observado.

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

Cuadro 2. Medias de mínimos cuadrados para porcentaje de cabritas mostrando actividad ovárica (Pubertad, % ¹) durante el período experimental Junio – Septiembre, así como peso vivo (PV, kg) y condición corporal (CC, unidades) al inicio (Junio=1) y al final (Septiembre=4) del período experimental en cabritas peripúberes (n=27) suplementadas con aminoácidos excitadores (AA) o Control (CC) bajo fotoperiodo natural en la Comarca Lagunera

Variables	AA	CC	NSO ²	EE ³
PUBERTAD	70.0 ^a	25.0 ^b	0.05	46.0
PV1	16.52 ^a	16.13 ^a	0.69	1.04
CC1	3.40 ^a	3.17 ^a	0.38	0.12
PV4	23.72 ^a	22.79 ^a	0.45	0.80
CC4	3.65 ^a	3.43 ^a	0.40	0.11

et al., 1987; Apter, 1997; Roth *et al.*, 2001; Apter y Hermanson, 2002; Teresawa, 2005; Clarkson y Herbison, 2006; Messinis, 2006; Ojeda *et al.*, 2006a,b). Solamente previo a la pubertad, el altamente eficiente sistema de retroacción negativa de los esteroides ováricos es particularmente activo, sin embargo, conforme avanza el estado puberal la señal de retroacción positiva de los esteroides ováricos se torna activo y altamente eficiente, observándose, usualmente el establecimiento de una ciclicidad normal al final de dicha etapa.

El inicio de la pubertad es un proceso controlado centralmente y los mecanismos detallados de dicho proceso aun son desconocidos. Se reconocen, sin embargo, incrementos en la actividad del pulso generador de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), y posteriormente en la secreción pulsátil de las hormonas gonadotrópicas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH). En la pubertad, la secreción pulsátil de gonadotropinas se incrementa durante el día, y promueve el desarrollo y función gonadal normales, lo anterior gracias a la activación del pulso generador de

GnRH (Huffman et al., 1987; Apter, 1997; Roth *et al.*, 2001; Apter y Hermanson, 2002; Teresawa, 2005; Clarkson y Herbison, 2006; Messinis, 2006; Ojeda *et al.*, 2006a).

Al respecto, el decapeptido GnRH es sintetizado en el área preóptica y el hipotálamo, y es liberado, en animales adultos, en forma pulsátil cada 60 minutos dentro del sistema porta que conecta el hipotálamo a la pituitaria, y se enlaza a su receptor de alta afinidad (GnRH-R) sobre la superficie celular de los gonadotrófos. En animales jóvenes, el intervalo del pulso es mucho mayor, 90-120 minutos; la aceleración de la frecuencia del pulso acompañada por un incremento en la amplitud del pulso, y por lo tanto en el nivel total de liberación de GnRH, activa señales de transducción para promover tanto la síntesis como la liberación intermitente de las gonadotropinas, LH y FSH, dando inicio así al proceso puberal (Huffman et al., 1987; Apter, 1997; Roth *et al.*, 2001; Apter y Hermanson, 2002; Teresawa, 2005; Clarkson y Herbison, 2006; Messinis, 2006; Ojeda *et al.*, 2006a).

El GnRH-R es una proteína-G ligada al receptor el cual activa la enzima fosfolipasa C, vía la generación de diversos segundos mensajeros como el diacilglicerol y el inositol, promoviendo la activación de la proteína quinasa C y la liberación de Ca del espacio intracelular, lo cual resulta en la síntesis y secreción de LH y FSH. La expresión de los GnRH-R está regulada por la propia GnRH así como por los esteroides gonadales (Apter, 1997; Roth *et al.*, 2001; Apter y Hermanson, 2002; Teresawa, 2005; Clarkson y Herbison, 2006; Messinis, 2006; Ojeda *et al.*, 2006a). Aún cuando los mecanismos mediante los cuales los aminoácidos excitadores ejercen una respuesta gonadotrófica han sido poco entendidos, se ha propuesto que el óxido nítrico pudiera estar involucrado en dicho proceso, al transmitir la señal del receptor a glutamato hacia los neurones liberadores de GnRH. En efecto, en ratas, la administración del inhibidor de la sintetasa del óxido nítrico bloquea la habilidad del receptor a glutamato para inducir la liberación hipofisiaria de LH.

Por su parte, los sistemas opioidérgicos y de aminoácidos neuroexcitadores muestran diferencias cuantitativas en la secreción GnRH-LH durante etapas prepuberales, peripuberales y el estado adulto. Los opioides muestran un marcado efecto inhibitorio en estados de prepubertad temprana decreciendo durante la maduración sexual hasta alcanzar la pubertad. En efecto, los opioides endógenos son importantes neurotransmisores inhibitorios que controlan la liberación pulsátil de LH en estado peripuberales (Ebling *et al.*, 1989). Los péptidos opioides como grupo no

parecen inhibir el inicio de la pubertad, pero es posible que su tono inhibitorio sea ejercido por un subset neuronal que selectivamente utilice para la neurotransmisión a la B-endorfina, la dinorfina o la Met/Leu-encefalina (Teresawa, 2005; Ojeda *et al.*, 2006b).

Por el contrario, los aminoácidos excitadores (EAA) incrementan su efecto estimulador sobre la secreción de GnRH-LH durante la maduración sexual mediante el incremento en la liberación de aspartato y glutamato, aminoácidos excitadores involucrados en la liberación de GnRH, así como aumentando la sensibilidad de los receptores NMDA a dichos aminoácidos (Mouguilevsky y Wuttke, 2001). Según Mahesh y Brann (2005) y Parent *et al.* (2005), los aminoácidos excitadores, glutamato en particular, ejercen un marcado efecto estimulador sobre el eje reproductivo, particularmente al momento de la pubertad. En efecto, la administración de glutamato y sus agonistas promueven la liberación pulsátil de LH en animales que han sido expuestos a los esteroides. Por el contrario, antagonistas de receptores ionotrópicos a glutamato inhiben la liberación de LH, aboliendo tanto la secreción de LH inducida por E2, así como el pico preovulatorio de LH. Según Teresawa (2005), la reducción puberal de inhibición GABAérgica es seguida por un incremento en el tono glutamatérgico.

Ojeda *et al.* (2006a) reportaron que el inicio de la pubertad requiere una comunicación recíproca neurón-células gliales, la cual involucra aminoácidos excitadores, principalmente glutamato y aspartato, y factores de crecimiento, además de la acción coordinada de un grupo de neuroreguladores que representan un elevado nivel de control que gobiernan el proceso de la pubertad. En el mismo sentido Dhandapani y Brann (2000) y Mahesh y Brann (2005), destacan que tanto el neuromodulador glutamato como el óxido nítrico han mostrado un papel esencial en el establecimiento del pico preovulatorio de GnRH en mamíferos.

Al respecto, se ha reportado que glutamato, N-metil-D-aspartato (NMDA) y kainato estimulan la secreción de GnRH en mamíferos inmaduros, mientras que la estimulación del receptor NMDA (NMDA-R) genera una pubertad precoz en ratas y monos. La pubertad es caracterizada por un incremento en la sensibilidad de GnRH a glutamato, así como un incremento en la actividad de la enzima glutamasa en el hipotálamo. La secreción de GnRH mediante neuronas glutamatérgicas y GABAérgicas parece ocurrir en forma estrictamente independiente en etapas peripuberales. Además, de la activación en la regulación transináptica glutamatérgica de GnRH, una coordinada actividad de las neuronas glutamatérgicas y células astrogliales han mostrado

jugar un rol activo durante la pubertad (Parent *et al.*, 2005).

Glutamato desarrolla diferentes acciones en el mecanismo hipotalámico de la pubertad como ha sido demostrado en diferentes modelos animales (Parent *et al.*, 2005). El área preóptica ha sido implicada como el sitio primario de acción de NMDA, mientras que agonistas de NMDA se ha sugerido que actúen principalmente al nivel de la eminencia media y el núcleo arqueado (Mahesh y Brann, 2005). La participación de los receptores de kainato en la inducción precoz de la pubertad-dependiente de estradiol, sugieren que esos receptores pueden estar involucrados en la activación de la secreción de GnRH mediada por estradiol y observada en la pubertad. Además, paralelo a la elevación de liberación de glutamato en hipotálamo durante el proceso de pubertad, los receptores AMPA están también incrementados y desarrollan un importante rol en mediar los efectos reguladores de glutamato durante el establecimiento de la pubertad (Zamorano *et al.*, 1998).

Como fue referido previamente, el glutamato ha sido implicado en los procesos críticos del establecimiento de la pubertad, pulsatilidad hormonal y comportamiento sexual. Se ha sugerido que glutamato puede promover muchos de estos efectos mediante la activación de la liberación del neurotransmisor gaseoso óxido nítrico (NO). Este neurotransmisor estimula la liberación de GnRH mediante la activación de la enzima guanilato ciclasa, quien a su vez promueve un incremento en la producción de cGMP y la posterior liberación de GnRH. Investigaciones recientes se han abocado a identificar las proteínas de anclaje que alinean los receptores de glutamato a las sinapsis y enlazan el sistema de neurotransmisión glutamato-óxido nítrico (Dhandapani y Brann, 2000).

Poco es lo que se sabe del control transcripcional de los genes que codifican las enzimas involucradas en la síntesis, metabolismo y transporte de glutamato (Ojeda *et al.*, 2006b). Sin embargo, la importancia de estos sistemas homeostáticos ha sido evaluada recientemente mediante el uso de técnicas cuantitativas proteómicas. En efecto, Roth *et al.* (2006) analizando algunas de las proteínas involucradas en la síntesis y degradación del glutamato en células astrogiales, reportaron que la enzima glutamato dehidrogenasa (GDH) cataliza la síntesis de glutamato y su más alto contenido en hipotálamo se observó durante el proestro, mientras que la enzima glutamina sintetasa (GS), la cual cataliza el metabolismo de glutamato a glutamina, decreció su contenido durante el proestro. Se observó una incrementada producción de glutamato y LHRH hipotalámico previo al pico preovulatorio de LH.

Lo anterior sugiere que el incremento en el efecto excitatorio generado por las señales glutamatérgicas de origen glial sobre las redes neuronales de LHRH, es un evento que contribuye a la activación de la secreción puberal de LHRH. La regulación transcripcional de la expresión de los transportadores vesiculares de glutamato puede representar un más importante punto de control de la homeostasis del glutamato, dado que los transportadores vesiculares de glutamato son extremadamente importantes en el control minuto-a-minuto de la liberación de dicho neurotransmisor (Ojeda 2006b).

CONCLUSIONES

Tanto el porcentaje como el inicio de la pubertad, determinada por los niveles séricos de P4, difirió ($P < 0.05$) entre grupos experimentales observándose un inicio más temprano así como un mayor porcentaje de cabritas mostrando actividad ovárica en el grupo suplementado con L-glutamato, con 70% mostrando actividad ovárica durante los 112 días que consideró el período experimental. Mientras que el peso vivo promedio al inicio del período experimental fue 16.65 ± 1.04 kg, y la condición corporal promedió 3.31 ± 0.12 unidades, no se observaron diferencias ($P > 0.05$) entre los grupos experimentales para las citadas variables a lo largo del período experimental. En efecto, ni el peso corporal ($P = 0.69$) ni la condición corporal ($P = 0.38$) difirieron entre tratamientos al inicio, durante y al final del período experimental.

LITERATURA CITADA

- Apter D. 1997.** Development of the hypothalamic-pituitary-ovarian axis. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 816:9-21.
- Apter D. y Hermanson E. 2002.** Update on female pubertal development. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* 14:475-481.
- Clarkson J. y Herbison, AE. 2006.** Development of GABA and glutamate signaling at the GnRH neurin in relation to puberty. *Moll Cell. Endocrinol.* 25:32-38.
- Cushwa, W.T; G.E. Bradford, G.H. Stabenfeldt; Y.M. Berger and M.R. Rally. 1992.** Ram influence on ovarian and sexual activity in anestrus ewes: effects of isolation of ewes from rams before joining and date of ram introduction. *J. Anim. Sci.* 70:1195-1200.
- Dhandapani KM y Brann DW. 2000.** The role of glutamate and nitric oxide in the reproductive neuroendocrine system. *Biochem. Cell. Biol.* 78:165-179.
- Ebling FJ, Schwarta ML. y Foster DL. 1989.** Endogenous opioid regulation of pulsatile hormone secretion during sexual maturation in the female sheep. *Endocrinology.* 125:369-383.
- Huffman LJ, Inskoop EK. y Goodman RL. 1987.** Changes in episodic luteinizing hormone secretion lead-

- ing to puberty in the lamb. *Biol. Reprod.* 37:755-761.
- Hughes IA, y Kumanan, M. 2006.** A wider perspective on puberty. *Moll. Cell. Endocrinol.* 25:1-7.
- Mahesh VB y Brann DW. 2005.** Regulatory role of excitatory amino acids in reproduction. *Endocrine.* 28:271-280.
- Messinis IE. 2006.** From menarche to regular menstruation: Endocrinological background. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1042:49-56.
- Moguilevsky JA y Wuttake W. 2001.** Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Exp. Clin. Endocrinol Diabetes.* 109:188-195.
- Ojeda SR, Roth C, Mungenast A, Heger S, Mastronardi C, Parent AS, Lomniczi A y Jung H. 2006a.** Neuroendocrine mechanisms controlling female puberty: new approaches, new concepts. *Int. J. Androl.* 29:286-290.
- Ojeda SR, Lomniczi A, Mastronardi C, Heger S, Roth C, Parent AS Matagne V, y Mungenast AE. 2006b.** The neuroendocrine regulation of puberty: Is time ripe for a systems biology approach? *Endocrinology.* 147:1166-1174.
- Parent AS, Matagne V. y Bourguignon JP. 2005.** Control of puberty by excitatory amino acid neurotransmitters and its clinical applications. *Endocrine* 28:281-286.
- Roth C, Schrickler M, Lakomek M, Strege A, Heiden I, Luft H, Munzel U, Wuttke W. y Jarry H. 2001.** Auto-regulation of the gonadotropin-releasing hormone (GnRH) system during puberty: effects of antagonistic versus agonistic GnRH analogs in a female rat model. *J. Endocrinol.* 169:361-371.
- Roth C, McCormack AL, Lomniczi A, Mungenast AE. y Ojeda SR. 2006.** Quantitative proteomics identifies a change in glial glutamate metabolism at the time of female puberty. *Moll. Cell. Endocrinology.* 254:51-59.
- Schneider F, and Hallford, DM. 1996.** Use of a rapid progesterone radioimmunoassay to predict pregnancy and fetal numbers in sheep. *Sheep Goat Res. J.* 12:33-38.
- Snedecor G. W. y Cochran W. G. 1967.** *Statistical Methods.* 6th ed. The Iowa State Univ. Press, Ames.
- Terasawa E. 2005.** Role of GABA in the mechanism of the onset of puberty in non-human primates. *Int. Rev. Neurobiol.* 71:113-129.
- Van den Pol A. N, Wuarin J. P, Dudek F. E 1990.** Glutamate, the dominant excitatory transmitter in neuroendocrine regulation. *Science* 250:1276-1278
- Whitlock KE, Illing N, Brideau NJ, Smith KM y Twomey S. 2006.** Development of GnRH cells: Setting the stage for puberty. *Moll. Cell. Endocrinol.* 25:39-50.
- Zamorano PL, Mahesh VB, De Sevilla L y Brann DW. 1998.** Excitatory amino acids receptors and puberty. *Steroids.* 63:268-270.
- Zapatero-Caballero H, Sanchez-Franco F, Fernandez-Mendez C, Garcia-Sanrutos M, Botella-Cubells LM y Fernandez-Vazquez G. 2004.** Gonadotropin-releasing hormone expression during pubertal development in rats. *Biol. Reprod.* 70:348-355.

