

## Evaluación de las fases del ciclo estral de la rata mediante frotis vaginales y mediciones hormonales

**Leonor Estela Hernández López<sup>1</sup>**

[leh1090967@gmail.com](mailto:leh1090967@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0003-1742-4603>  
Instituto Nacional de Psiquiatría,  
“Ramón de la Fuente Muñiz”,  
México.

**Ricardo Mondragón Ceballos**

[mondragonceballos@gmail.com](mailto:mondragonceballos@gmail.com)  
<https://orcid.org/0000-0002-3252-8702>  
Instituto Nacional de Psiquiatría,  
“Ramón de la Fuente Muñiz”,  
México.

**Jorgelina Barrios De Tomasi**

[jorgelina@uqroo.edu.mx](mailto:jorgelina@uqroo.edu.mx)  
<https://orcid.org/0000-0002-4626-615X>  
Universidad Autónoma del Estado de  
Quintana Roo.  
Quintana Roo.

### RESUMEN

El ciclo ovárico es el proceso de selección, maduración y crecimiento folicular hasta la ovulación y la preparación del útero para la gestación. Ocurre mediante la intercomunicación entre los ovocitos, las células de la granulosa, células de la teca y diversas células del sistema inmune y endócrino. Las funciones celulares están reguladas por las hormonas hipofisarias: luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), junto con los esteroides ováricos: estrógenos, andrógenos y progestágenos. Las variaciones en las concentraciones hormonales generan cambios físicos, cognitivos y emocionales en las hembras. Por lo que, al incluirlas como modelos en los protocolos de investigación, resulta necesario evaluar las fases y duración de los ciclos, pues estas variables pueden sesgar los resultados. Para el seguimiento de las fases se han desarrollado diferentes métodos, siendo la evaluación de la citología vaginal el más utilizado aunque poco preciso. Por el contrario, las mediciones hormonales séricas, urinarias, fecales o salivales son más precisas, pero costosas y tardadas. Consecuentemente, lo ideal sería la combinación de varias técnicas de evaluación. Sin embargo, la decisión dependerá de la naturaleza de cada experimento. Esta revisión describe, los mecanismos fisiológicos del ciclo estral y las hormonas que actúan en cada etapa. Describe el ciclo ovárico de la rata adulta, ya que es la especie más usada en el laboratorio como modelo experimental, incluye la evaluación de los cambios celulares del epitelio vaginal, describiendo las principales técnicas de tinción. Por último, refiere los métodos de medición hormonal más comunes con sus ventajas y desventajas.

**Palabras clave:** ciclo estral; citología vaginal; medición hormonal; rata.

---

<sup>1</sup> Autor Principal

# **Evaluation of the phases of the estrous cycle of the rat by means of vaginal smears and hormonal measurements**

## **ABSTRACT**

The ovarian cycle is a process of selection, maturation and follicular growth until ovulation and the preparation of the uterus for gestation. These events occur through the intercommunication between oocytes, granulosa cells, theca cells, and the immune and endocrine systems. These structures are regulated by pituitary hormones: luteinizing and follicle stimulating, altogether with ovarian steroids: estrogens, androgens and progestins. Throughout each cycle, variations in hormonal concentrations generate physical, cognitive, and emotional changes in females. For this reason, when including them in research protocols, it is necessary to consecutively evaluate the phases of the cycles, the duration of the phases and whether the cycles are ovulatory or anovulatory, among others, as these variables could bias the results obtained. Different methods have been developed to monitor the phases, the evaluation of the vaginal cytology being the simplest, cheapest, and fastest, although not very accurate. In contrast, serum, urinary, fecal, or salivary hormone measurements are more accurate, but expensive, and results cannot be obtained immediately. Consequently, the ideal could be the combination of diverse evaluation techniques, however, the decision will depend on the nature of each experiment. In this review, we describe, succinctly, the physiological mechanisms that underlie each phase of the estrous cycle and the hormones that act predominantly in each stage. Subsequently, we described the ovarian cycle of the rat, which is one of the most used species in the laboratory, by the evaluation of the cellular changes of the vaginal epithelium, describing the main staining techniques. Finally, are referred the most common hormonal measurement methods with their advantages, and disadvantages.

**Keywords:** *estrous cycle; vaginal cytology; hormonal measurement; rat.*

*Artículo recibido 01 abril 2023*

*Aceptado para publicación: 15 abril 2023*

## INTRODUCCIÓN

En 1917 Stockard y Papanicolaou estudiaron los cambios que ocurrían con respecto al volumen, textura del moco cervical y el epitelio vaginal de varias hembras de cuyo (Stockard & Papanicolaou, 1917). Analizaron diariamente a estos animales por un período de tiempo prolongado y así establecieron las cuatro fases de los ciclos estrales en esta especie, su duración y el tiempo promedio de cada ciclo. Este estudio fue el primero en develar que el epitelio vaginal cambiaba de manera simultánea con los ciclos ováricos. Pocos años después, en 1922 Evans y Long basados en ese trabajo, publicaron el ciclo estral de la rata (Evans & Long, 1922) y la ratona, además de la presencia de las hormonas hipofisarias luteinizante (LH) y folículo estimulante (FSH), demostrando su interacción con el ovario y el útero. Un año más tarde, Allen y Doisy (1923) describieron el efecto de los estrógenos y andrógenos ováricos en los órganos reproductivos. Posteriormente a estos trabajos, que fueron los pioneros sobre los ciclos ováricos, un gran número de investigadores se han dedicado a averiguar más detalladamente los procesos fisiológicos que subyacen a estos ciclos y los cambios funcionales y anatómicos que generan.

Se conoce que los ciclos ováricos son los procesos de selección, maduración y crecimiento folicular hasta la ovulación y la preparación del útero para la gestación. Estos eventos ocurren a través de la intercomunicación entre los ovocitos, células de la granulosa, células de la teca y los sistemas inmunitario, endócrino y vascular (Richards, 2018). Todas esas estructuras y sistemas están regulados por señales hipotalámicas e hipofisarias, que actúan mediante neurotransmisores y hormonas, además de la expresión de una gran variedad de genes (Albertini, 2015; Reddy et al., 2008). El equilibrio y la eficacia de estos procesos son indispensables para que la reproducción de la hembra sea exitosa, de ahí la importancia de estudiarlos y entenderlos a cabalidad. Por otra parte, las variaciones cíclicas de las concentraciones de las hormonas sexuales tienen una gran repercusión no sólo en lo concerniente a lo reproductivo, sino también en algunos procesos cognitivos y emocionales de las hembras (Farage et al., 2010; Le et al., 2020), los cuales han sido atendidos por la neurociencia. Sin embargo, a pesar de lo mucho que ya se conoce en esta área, todavía existen algunos aspectos que no están totalmente esclarecidos, por lo que hoy en día continúan las investigaciones a este respecto.

Cabe mencionar que, dado que cada fase del ciclo está regulada por diferentes mecanismos neuroendocrinos que influyen en diversos aspectos tanto fisiológicos como conductuales, es importante conocer el estado reproductivo en el que se encuentran las hembras en estudio. Es por esto por lo que se han ido desarrollado técnicas como la medición hormonal sérica, fecal, urinaria o salival (para determinar con la mayor exactitud posible y menos invasiva) la influencia hormonal en las fases del ciclo estral (Dorgan et al., 2002; Faupel-Badger et al., 2010), que, si bien es cierto que estas mediciones no permiten hacer un seguimiento diario, sí son de utilidad para cotejar *a posteriori* los cambios en la citología vaginal con los niveles hormonales. Por lo tanto, la evaluación diaria por citología vaginal de los ciclos estrales no cae en desuso por su utilidad al ser una técnica poco invasiva, descriptiva, económica e inmediata, pero por ser poco exacta es muy conveniente incluir, a la par, mediciones hormonales seriadas.

El objetivo de la presente revisión es, primero hacer una descripción general de los mecanismos fisiológicos que subyacen a cada fase del ciclo estral para explicar cuáles hormonas están actuando predominantemente en cada etapa. Posteriormente, se describe el ciclo ovárico de la rata por ser una de las especies más usadas en el laboratorio y los cambios en el epitelio vaginal y su evaluación por citología, incluyendo las principales técnicas de tinción. Por último, se refieren las técnicas de medición hormonal con sus ventajas y desventajas.

### **Generalidades del ciclo ovárico y su regulación hormonal**

Todos los eventos que ocurren durante los ciclos ováricos por efecto de las hormonas hipofisarias y los esteroides ováricos tienen dos finalidades: producir ovocitos maduros listos para ser ovulados y posteriormente fertilizados y preparar al tracto reproductor de la hembra para la implantación del o los huevos ya fecundados. Así, en cada etapa del ciclo suceden adecuaciones tanto del sistema reproductor como del neuroendócrino para que se lleve a cabo la reproducción de manera exitosa.

El ciclo ovárico se divide en las fases: folicular o proestro, periovulatoria o estro, lútea o metaestro y diestro, que en los ciclos menstruales incluye la menstruación (Cora et al., 2015). La duración de cada una de esas fases varía según la especie, pero en todos los mamíferos los ciclos ováricos están regulados por la interrelación de las gonadotropinas hipofisarias: LH y FSH, los esteroides ováricos:

estrógenos, andrógenos y progestágenos (Owen, 1975) y la inhibina una hormona gonadal no esteroidal (Zelevnik & Plant, 2015)

### *Ovarios*

Durante el desarrollo embrionario de las hembras se activa la transcripción del gen *Star8* y *Dazl* los cuales provoca que las células germinales primordiales detengan su división celular en el diploteno de la profase I de la meiosis (Liu et al., 2009; Falender et al., 2005), donde permanecerán hasta el momento de la ovulación. Esas células se rodean de una capa de células somáticas o células pregranulosas formando los folículos primarios. Posteriormente, cuando las hembras entran a la edad reproductiva se reactiva el crecimiento y la diferenciación de las células germinales primarias y es en ese momento cuando las hormonas hipofisarias empiezan a jugar un papel determinante (Richards, 1980).

### ***Foliculogénesis***

En los estadios tempranos del desarrollo folicular, los folículos son especialmente sensibles a la FSH, esta hormona facilita la producción de estrógenos en las células de la granulosa y la producción de inhibina (Zelevnik & Plant, 2015). El incremento local de estradiol induce la liberación de factores de crecimiento que favorecen el desarrollo del folículo (Pangas & Rajkovic, 2015). Asimismo, el estradiol junto con la FSH y la inhibina promueven la síntesis de receptores para LH en el folículo. La LH se une a los receptores de las células de la teca que producen principalmente andrógenos, los cuales son aromatizados a estrógenos por el complejo enzimático p450arom (aromatasa) en las células de la granulosa (Fitzpatrick & Richards, 1994), que son las células que van rodeando al ovocito conforme va madurando. El inicio del proceso de maduración del ovocito empieza a partir de que éste se rodea de la zona pelúcida, una capa de glicoproteínas que le sirve de protección y reconocimiento de los gametos de las especies. A su vez, al momento de la fecundación, durante la reacción cortical y de zona, inhibe la poliespermia y una vez fecundado, evita la infiltración de leucocitos y microorganismos (Lefièvre et al., 2004).

Además de los esteroides, tanto en las células de la granulosa como de la teca, también se producen otras sustancias que están mediadas por la máxima secreción de LH, tales como prostaglandinas, citocinas quimiotácticas y mediadores paracrinos asociados con la inflamación (Duffy et al., 2019).

Esos mediadores activan al sistema inmune atrayendo células de defensa que debilitan la lámina basal y facilitan la invasión de células endoteliales. Los mediadores inflamatorios, junto con las prostaglandinas, por un lado, activan los genes que controlan la formación y estabilización de la matriz del complejo ovocito-cúmulo celular (COC) y por otro, desencadenan la expansión del cúmulo, reanudan la meiosis del ovocito y favorecen el desprendimiento del COC de las células de la granulosa basal (Duffy et al., 2019).

### ***Ovulación***

Cuando el ovocito completa su proceso de maduración, las concentraciones de estradiol alcanzan sus niveles máximos (Richards, 1980; Zeleznik & Plant, 2015). La máxima secreción de estradiol actúa como una señal de ovulación, provocando un aumento de la LH el cual inhibe a la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y a la inhibina que, en roedores, se produce en el líquido folicular durante su desarrollo (Fujii et al., 1983). Contrariamente en primates, incluidas las mujeres, la inhibina no se produce en el folículo sino en el cuerpo lúteo y su función es detener la producción de la FSH (Han et al. 2023).

La progesterona se produce en pequeñas cantidades en los folículos preovulatorios, se une a los receptores del núcleo de las células de la granulosa y juega un papel esencial en la expresión de los genes involucrados tanto en la ovulación como en la formación del cuerpo lúteo (Mishra et al., 2015). Sin embargo, la mayor producción de esta hormona ocurre hasta después de la ovulación. Las células de la granulosa remanentes del folículo que ovuló se luteinizan a través de la acción de factores angiogénicos que provienen del fluido folicular (Frederick et al., 1984). Dichos factores promueven la proliferación de capilares sanguíneos y fibroblastos en la lámina basal de las células de la granulosa. A través de esa nueva microcirculación, el colesterol llega a las células luteinizadas y se convierte en progesterona por la acción del citocromo P450 y la alfa-hidroxi-deshidrogenasa (Taraborrelli, 2015). La fase lútea en algunos mamíferos termina en cuanto el óvulo es fecundado y se produce la implantación en el tejido uterino, pues en ese momento el cuerpo lúteo es reclutado por el efecto de la gonadotropina coriónica (Srisuparp et al., 2001) y no de la progesterona (Halasz & Szekeres-Bartho, 2013). Si la fertilización e implantación no ocurren, empieza la regresión o lisis del cuerpo lúteo en cuerpo *albicans* o blanco. Al principio de la fase lútea la producción de progesterona es constante,

posteriormente empieza a producirse en pulsos sincronizados con los de la LH, y conforme va pasando el tiempo la frecuencia de los pulsos se va espaciando (Wuttke et al., 2001). Por esa razón es que las concentraciones de progesterona se mantienen elevadas solamente durante la fase lútea temprana, posteriormente empiezan a descender hasta que en la fase lútea tardía las concentraciones son muy bajas (Wuttke, et al., 2001).

En síntesis, el estradiol se produce en las células de la granulosa durante el desarrollo folicular. Sin embargo, los andrógenos que se originan en las células de la teca bajo la influencia de la LH promueven la actividad de la aromatasa estimulada por la FSH para transformar a los andrógenos en estrógenos (Barbieri, 2014). Por lo tanto, la biosíntesis de los estrógenos totales producidos en el folículo en crecimiento sucede por la influencia de las hormonas gonadotrópicas y requiere de la interrelación entre las células de la granulosa y de la teca del folículo, a lo que se le conoce como “la teoría de las dos células y dos gonadotropinas” (Barbieri, 2014; Yen et al., 2019).

La función de los estrógenos es, incrementar la actividad aromática responsable de su propia formación, promover la foliculogénesis, incrementar la expresión de receptores para gonadotropinas (Lee et al., 2021), incrementar la síntesis de conexinas entre las células de la granulosa (Kaushik et al., 2020) e inhibir su apoptosis (Richards, 2018).

Los andrógenos por su parte promueven la síntesis de progestinas y la actividad de la aromatasa para incrementar los niveles de estrógenos (Zelevnik y Plant, 2015). Sin embargo, el equilibrio entre las hormonas hipofisarias y la producción de esteroides ováricos es muy sensible, ya que, por ejemplo, en ausencia de gonadotropinas los andrógenos producen atresia folicular, apoptosis ovárica y luteinización temprana del folículo (De Tomasi et al., 2012; Rosales Torres & Sánchez Guzmán, 2008). Asimismo, si la concentración de andrógenos como la dihidrotestosterona por ejemplo, es más alta de lo normal, puede inhibir la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa (Richards, 1980).

Por último, la función de la progesterona es esencial tanto para la ovulación, como para la luteinización del folículo después de la ovulación. Si los niveles de esta hormona se mantienen por debajo de lo normal, el porcentaje de ovulación disminuye provocando infertilidad aun cuando los ciclos sean regulares (Hansen et al., 2018).

Esta breve descripción de los eventos que ocurren durante el desarrollo y maduración del folículo ovárico, para culminar en la ovulación y la formación del cuerpo lúteo muestran someramente el efecto de los esteroides sexuales y las hormonas hipofisiarias en el ovario, A continuación, se describen los efectos de estas mismas hormonas en los cambios del epitelio vaginal a lo largo del ciclo ovárico de la rata por ser el modelo animal más usado en los laboratorios.

### **Ciclo estral de la rata y su evaluación por citología vaginal**

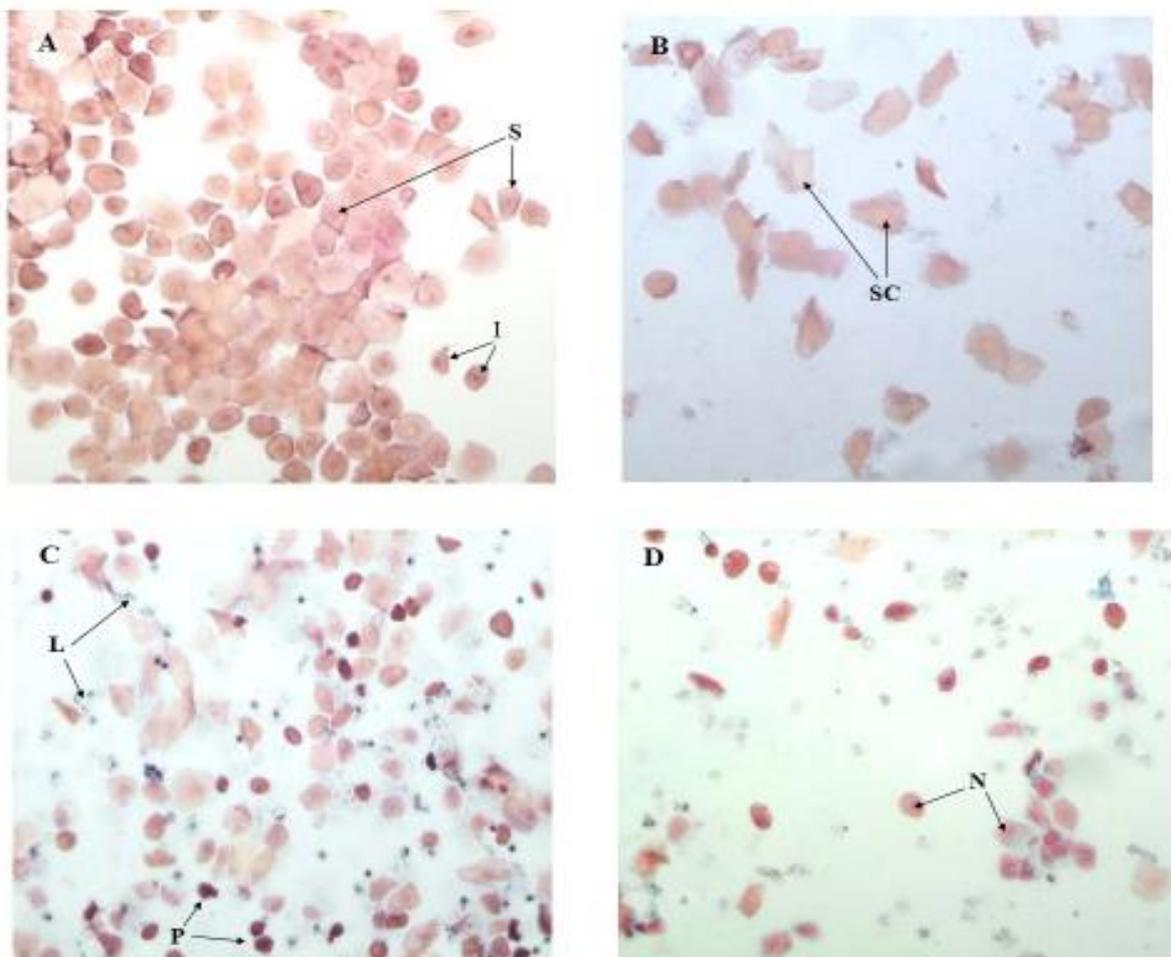
De acuerdo con Evans y Long (1922) el ciclo estral de la rata tiene una duración total de entre 4 y 5 días. Se divide en cuatro fases que tienen una duración promedio de: 12 a 18 horas de proestro, entre 9 y 12 horas de estro, metaestro de 10 a 14 horas y el diestro que es la fase más larga, con una duración de 55 a 72 horas. Sin embargo, algunos autores dividen los ciclos solamente en proestro, estro y diestro (Goldman et al., 2007), mientras que otros, toman en consideración las fases de transición que incluyen el momento entre una fase y otra. En esos casos los cambios en el epitelio vaginal aún no se pueden identificar como característicos de una fase determinada, por lo tanto, se clasifican como de transición y se calcula que las concentraciones hormonales que rigen la fase aún no están en los niveles máximos. Por tanto, la clasificación de las fases del ciclo estral puede hacerse arbitrariamente dependiendo de la naturaleza del trabajo que se esté llevando a cabo.

El seguimiento de las fases por citología vaginal es útil siempre y cuando se tomen en cuenta algunas consideraciones. En primera instancia, los roedores por ser especies nocturnas son muy sensibles a los cambios de horas luz-oscuridad, así que las citologías vaginales se deben coleccionar preferentemente a la misma hora y mantener a las hembras en un régimen horario de 12 horas luz por 12 oscuridad (Cora et al. 2015). Con respecto a otros factores que pueden generar variaciones en los ciclos son: la edad, el estado nutricional, el estrés, las relaciones sociales y la temperatura. Por lo que es importante reducir al máximo cualquier factor que pueda generar variaciones en los ciclos (Cora et al. 2015).

La evaluación de las fases del ciclo ovárico por citología vaginal se hace observando la presencia y proporción de las células del epitelio vaginal, su forma y tamaño de sus núcleos. Además de la manera en que están dispuestos los cúmulos celulares. De acuerdo con esas características las células epiteliales se dividen en: parabasales, intermedias, superficiales y de descamación (Antonov, 2017). Estas células indican el grado de diferenciación de las células del epitelio escamoso simple del canal

vaginal por el efecto de las hormonas sexuales. Por otra parte, otras características útiles en la evaluación de las citologías vaginales son, la cantidad y consistencia del moco cervical, y la presencia de leucocitos y eritrocitos.

Las células epiteliales superficiales y de descamación son las más maduras y las menos cercanas a la lámina basal (Cora, et al. 2015) Estas células se caracterizan por ser acidófilas (también conocidas como eosinofílicas) por lo que se aprecian de color rosa al usar cualquier técnica de tinción multicromática. Por el contrario, las células parabasales son basófilas (o cianofílicas) se tiñen de color azul a violeta (Paccola et al., 2013).



**Figura 1.** Fases del ciclo estral de la rata. **A:** proestro; **B:** estro; **C:** metaestro; **D:** diestro; **I:** células intermedias; **L:** leucocitos; **N:** núcleos celulares; **P:** células parabasales; **S:** células superficiales; **SC:** células de descamación.

### ***Proestro***

Esta fase, como su nombre lo indica, se presenta antes del estro que es la fase durante la que ocurre la ovulación. La citología vaginal de una rata hembra en proestro se distingue por la presencia de células superficiales nucleadas, estas células son angulares con sus bordes muy bien definidos (Cora et al., 2015; Goldman et al., 2007; Toral Delgado, 2017). En esta fase no se observan leucocitos. En el caso de que se tomen en cuenta las fases intermedias, en el proestro temprano se pueden observar células intermedias. Dichas células denotan la transición de las células parabasales a superficiales, por lo que son células que aún no tienen los bordes definidos y los núcleos, aun cuando todavía se observan grandes, ya no ocupan el mayor volumen del citoplasma. Mientras que en el proestro tardío, predominan las células superficiales y se pueden empezar a observar células de descamación, las cuales son mucho más abundantes en el estro (Fig. 1)

### ***Estro***

Esta fase ocurre generalmente a medianoche. Se caracteriza porque el epitelio vaginal alcanza su mayor crecimiento y por ese motivo se observa una gran población de células epiteliales de descamación (Cora et al., 2015; Goldman et al., 2007; Toral Delgado, 2017). Estas células son anucleadas, translúcidas y normalmente se encuentran en cúmulos rodeados de moco cervical blanquecino (Fig. 1). No se observan leucocitos, sino hasta que empieza la fase de transición tardía donde empiezan a aumentar.

### ***Metaestro***

En esta fase la población de leucocitos (básicamente neutrófilos) aumenta de manera importante. Todavía se pueden observar células escamosas, pero la presencia de células intermedias es predominante en la citología vaginal. El metaestro se considera una fase de transición entre el estro y el diestro (Cora et al., 2015; Goldman et al., 2007; Toral Delgado, 2017). Al final de esta fase empiezan a aumentar las células parabasales (Fig. 1).

### ***Diestro***

Esta es la fase más larga del ciclo. Se distingue porque el epitelio vaginal tiene el menor número de estratos celulares y por lo tanto las células que se observan en la citología son predominantemente leucocitos y células parabasales que aumentan conforme avanza la fase (Cora et al., 2015; Goldman et

al., 2007; Toral Delgado, 2017). Las células parabasales se distinguen por ser células redondas, de núcleos grandes que ocupan casi todo el citoplasma y se tiñen de color azul. Se observan en cúmulos tipo “racimo de uvas” y en todo momento se siguen observando leucocitos alrededor de las células epiteliales. Nuevamente, al final del diestro, que sería la fase de transición para iniciar nuevamente el ciclo, se empiezan a observar células intermedias y algunas superficiales, asimismo, mientras que empieza a decrecer la población de leucocitos (Fig. 1). (Paccola et al., 2013; Cora et al., 2015).

### ***Preñez***

Si la hembra es preñada, en la citología vaginal se observan células intermedias, leucocitos y moco cervical (Bekyürek et al., 2002).

### ***Senectud***

La citología vaginal en hembras seniles se caracteriza por la presencia de células de descamación a intervalos irregulares y por periodos prolongados combinada con leucocitos (Ingram, 1959).

### **Técnicas para la colecta y tinción de frotis vaginales**

Los frotis vaginales se pueden colectar por lavado vaginal. En ratas se introduce con un gotero de 0.2 a 0.25 ml de solución salina o agua destilada por el canal vaginal. Posteriormente se absorbe el lavado, se pone una gota de este lavado en un portaobjetos y se hace la evaluación microscópica. Otra técnica para obtener los frotis es mediante hisopos lubricados que se introducen por la vagina, se hace un ligero movimiento circular para que las células queden adheridas al hisopo. Inmediatamente después se unta sobre el portaobjetos girando sobre este la punta de algodón (Cora et al., 2015; Goldman et al., 2007).

Cabe señalar que, tanto la punta del gotero, como el hisopo no deben ser introducidos a más de un centímetro de la entrada del canal vaginal, ya que, de hacerlo, se corre el riesgo de sobre estimular el cervix e inducir pseudo preñez (Cora et al., 2015; Goldman et al., 2007).

Las observaciones al microscopio de las citologías vaginales en ambos casos se pueden hacer inmediatamente después de obtener las muestras vaginales sin usar ninguna tinción. En general se hace así cuando no es necesario tener un archivo de los cambios que se presentan y solamente se hacen para tener un seguimiento diario del ciclo de las hembras. Así, se observan las citologías, se registran los datos obtenidos por hembra y se pueden reusar los portaobjetos. No obstante, cuando el protocolo

de investigación incluye cambios fisiológicos que se reflejan en la citología vaginal, entonces es indispensable tener un registro citológico. En esos casos es recomendable la tinción y fijación de a muestra para la preservación de las citologías.

### **Tinciones**

Se han descrito varias técnicas de tinción que pueden resultar eficientes para la evaluación de las citologías vaginales. La principal diferencia en la efectividad de las distintas técnicas es si son multi o monocromáticas. Las técnicas multicromáticas como Papanicolaou y tricrómica de Shorr y en menor grado el Diff-Quick, tienen algunas ventajas sobre las técnicas monocromáticas. Dichas ventajas incluyen distinguir con detalle la diferencia entre el núcleo y el citoplasma, facilitando la clasificación de los tipos celulares, especialmente las células superficiales y las escamas de manera más exacta. Además, la posibilidad de diferenciar entre las células acidófilas (superficiales y escamas) y basófilas (parabasales e intermedias); facilita también el reconocimiento de la madurez celular. Por último, permiten observar con facilidad la presencia de leucocitos y eritrocitos. Las desventajas es que son técnicas más costosas y elaboradas que las técnicas monocromáticas.

#### ***Tricrómica de Shorr***

Esta técnica es una modificación de la tricrómica de Masson (Shorr, 1928). Es una tinción que tiñe en distintas tonalidades al citoplasma celular conforme su grado de cornificación. Es una tinción rápida, que permite almacenar por varios años las muestras teñidas.

#### ***Diff-quick***

Es una técnica modificada de la tinción de Wright-Giemsa, pero más rápida. Esta técnica también ofrece la posibilidad de conservar las muestras por varios años. No obstante, la afinidad por las diversas estructuras y la distinción entre las células acidófilas y basófilas no es tan específica como lo son Papanicolaou o tricrómica de Shorr.

#### ***Papanicolau***

Es una técnica también multicromática con las mismas ventajas que la tricrómica de Shorr. Sin embargo, su mayor desventaja es el tiempo que tarda el protocolo de tinción que es entre 25 y 30 minutos.

### ***Azul de metileno***

Es una de las técnicas monocromáticas más usadas por su sencillez. Sin embargo, tiene la desventaja de que los eritrocitos no se tiñen y las muestras no se pueden almacenar para observarse posteriormente.

### **Cuantificación hormonal**

Actualmente existen diversas herramientas para la cuantificación de hormonas en los laboratorios de endocrinología e investigación. Estos análisis son cruciales para proporcionar información sobre el estatus reproductivo que permite el diagnóstico o la explicación de un hecho de una manera eficaz.

***Los podemos clasificar en dos grandes subgrupos dependiendo del fundamento en el que se basan para su función:***

- 1) Inmunoensayos (radioinmunoensayos, inmunoensayos de adsorción e inmunoensayos quimioluminoscentes)
- 2) Espectrofotometría de masas

### **Inmunoensayos**

El principio básico de los inmunoensayos consiste en crear una reacción de unión entre un antígeno o analito (que es la sustancia o muestra que se desea saber su concentración) con un anticuerpo altamente específico contra dicho antígeno.

Un antígeno es cualquier sustancia que al introducirse a un organismo induce o genera una respuesta inmune, provocando la formación de anticuerpos. Mientras que un anticuerpo es una molécula producida y secretada por células plasmáticas, (linfocitos principalmente) en respuesta a un antígeno.

Al inmunizar a un animal con un antígeno específico, se provoca una respuesta inmune, produciendo una gran cantidad de anticuerpos. Estos anticuerpos se colectan y purifican para ser utilizados en los diferentes tipos de inmunoensayos, mediante la formación de complejos antígeno-anticuerpo.

Existen dos tipos de inmunoensayos, dependiendo de la disponibilidad del reactivo: 1) los competitivos o de reactivo limitante y 2) los no competitivos o con exceso de reactivo, también llamados tipo sándwich o inmunométricos. En los inmunoanálisis competitivos, las hormonas por cuantificar compiten con un antígeno (de la misma naturaleza) marcado por la unión al anticuerpo. De esta manera, una mezcla del antígeno (hormona) con el antígeno marcado compiten por la unión al

anticuerpo, de tal manera que mientras mayor sea la concentración de la hormona en una muestra experimental menor será el antígeno marcado que se una al anticuerpo. La señal obtenida dada por la cuantificación de la marca será inversamente proporcional a la concentración de la hormona que se desea cuantificar. Por otra parte, en los ensayos no competitivos, no es el antígeno el que se marca para competir por la unión al anticuerpo, sino se marca el anticuerpo y es libre de unirse al sitio antigénico de la hormona. La señal obtenida dada por la cuantificación de la marca es proporcional a la concentración de la hormona que se desea cuantificar.

### ***Radioinmunoensayos (RIAs)***

Los primeros métodos de medición hormonal eran muy poco precisos, de hecho, se cuantificaban en el orden de los gramos, miligramos y en algunos casos hasta microgramos. Después de 1960 se empezaron a desarrollar métodos más precisos y la sensibilidad de las pruebas permitieron mediciones de hasta nano-, pico- y fentogramos.

El radioinmunoanálisis (RIA) fue descrito en 1959 por Berson y Yalow (1959) basando su teoría en el desplazamiento isotópico por competencia (Stanczyk et al., 2007). En este ensayo una hormona marcada radiactivamente compite con la hormona (no marcada) de una muestra de concentración desconocida por la unión a un anticuerpo, de tal manera que la cantidad de hormona marcada radiactivamente es inversa a la cantidad de hormona sin marcar de la muestra desconocida (Stanczyk et al., 2007). Debido a que los anticuerpos utilizados en un RIA son diseñados para la competitividad del inmunoensayo, generalmente son altamente específicos. Es por esto por lo que en los años 80 fue considerada como la técnica ideal para la cuantificación de hormonas esteroides y glicoproteicas en suero (Tan et al., 2018). A pesar de que el RIA fue por mucho tiempo el método más confiable, tenía varias desventajas: requerían de una gran inversión de tiempo (2 a 3 días), la sensibilidad relativa era baja, requería un alto volumen de muestra (60µl) y tenía bajo rango dinámico (2-60 ng/mL), aunado al riesgo del personal expuesto a las radiaciones (Tan et al., 2018). El RIA fue una técnica ampliamente utilizada hasta los años 90, la cual fue posteriormente desplazada por técnicas como la quimioluminiscencia o fluorescencia donde se utilizan marcadores enzimáticos o fluorescentes en lugar de isotopos radiactivos, lo cual permitió disminuir la producción de desechos radiactivos y el

costo. Estas técnicas también se basan en el principio de desplazamiento siguiendo las leyes de acción de masa.

### ***Inmunoensayos Enzimáticos de adsorción (ELISAs)***

El ensayo inmunoenzimático de adsorción o ELISA es un inmunoensayo de desplazamiento. Entre sus ventajas es que no emplea material radiactivo, es económico y requiere poca cantidad de muestra. Sin embargo, también tiene la desventaja de que frecuentemente se sobreestiman las concentraciones hormonales debido a la falta de especificidad del anticuerpo. Generalmente, el antígeno utilizado en la técnica de ELISA se encuentra unido a una fase sólida, es decir, que son previamente fijados a los pozos de microplacas rígidas de poliestireno, polivinil o polipropileno (Aydin, 2015). Las placas tienen la capacidad de retener en su superficie al antígeno y al anticuerpo, pero no otros componentes de la fase líquida, lo que se le conoce como adsorción. Las enzimas más comúnmente empleadas en los ELISAs son: peroxidasa del rábano (HRP, por sus siglas en inglés), fosfatasa alcalina, glucosa-oxidasa, acetilcolinesterasa y betagalactosidasa, las lecturas de esta última a diferencia de las otras se hacen con un fluorómetro, mientras que las primeras con un espectrofotómetro con un rango de 400 a 600nm dependiendo de las características del conjugado (Aydin, 2015). La reacción enzimática es bastante rápida por lo que se pueden obtener resultados en menos de una hora (Aydin, 2015).

En el mercado podemos encontrar cuatro tipos de ELISAs: directos, indirectos, tipo “sándwich” y los competitivos, cada uno de ellos tiene diferentes características y usos. El método directo fue el primero en desarrollarse alrededor de 1971 y es empleado para determinar cantidades de antígenos (Ag, también conocido como analito) de alto peso molecular. Se llama directo debido a que la superficie de la microplaca es recubierta directamente con el anticuerpo (Ac) específico que identifica al antígeno (Ag). Posteriormente, el Ag se añade a la placa (previamente cubierta con el Ac) y se deja un tiempo de incubación. En esta técnica, el Ag o el Ac se encuentran marcados con una enzima. La incubación es seguida por varios lavados. Finalmente se agrega un sustrato apropiado que produce la señal colorimétrica la cual es medida con un espectrofotómetro de luz. La señal medida determina la cantidad de Ag o de Ac (Aydin, 2015). La cantidad de color en la muestra determina la concentración del antígeno deseado, de tal manera que una falta de coloración sería interpretada como un resultado negativo.

Cabe señalar que, algunos estudios determinaron que los inmunoensayos directos no tienen la suficiente sensibilidad y especificidad para cuantificar concentraciones bajas de esteroides, como en el caso de muestras séricas de mujeres menopáusicas, hembras seniles, machos o en individuos con tratamiento de inhibidores de la aromatasa (Dowsett & Folkerd, 2005; Stanczyk et al., 2003).

En 1978 se desarrolló el ELISA indirecto, el cual recibe su nombre porque lo que lo determina no es la cantidad de Ag unido a un primer Ac fijado en la superficie sino a un segundo. En esta técnica, el Ag es fijado a la superficie de la microplaca, posteriormente se agrega un primer Ac para obtener un complejo Ag-Ac, después de un lavado se agrega un segundo Ac (marcado enzimáticamente) que reconoce al primer anticuerpo. Este paso permite que la señal se magnifique. Finalmente, después de un lavado, se agrega un sustrato para la enzima para producir color. Este método es el más utilizado en los laboratorios de endocrinología (Aydin, 2015).

El ELISA tipo sándwich se implementó en 1977. En esta técnica el primer anticuerpo es fijado a la microplaca, posteriormente se agrega la muestra con el Ag que se desea cuantificar. Tras una breve incubación que remueve los antígenos no unidos al Ac, se agrega un segundo anticuerpo marcado enzimáticamente. Para determinar la actividad enzimática se añade un sustrato al medio y se asegura la coloración. Como el antígeno se encuentra atrapado entre dos anticuerpos es que se le conoce como tipo sándwich. Este tipo de ELISA ha demostrado ser entre dos y cinco veces más sensitivo que los otros ELISAs, por lo que son actualmente más comunes en los laboratorios de diagnóstico (Aydin, 2015).

Mientras que el ELISA competitivo se empezó a usar más tempranamente (1976). En esta técnica, la superficie de las microplacas está recubierta o con el Ac específico para el Ag que se desea medir o con el Ag. Tanto la muestra a ser determinada como el Ag o Ac marcado enzimáticamente se agregan al mismo tiempo, por lo que compiten entre ellos para unirse al Ac o al Ag que está unido en la superficie. En este tipo de ensayo hay una proporción inversa entre la concentración del analito y la intensidad de la coloración. De tal manera si la intensidad de la coloración del Ag o Ac analizado tiene una alta absorbancia su concentración es menor y viceversa (Aydin, 2015).

Cabe señalar que anteriormente los inmunoensayos analizaban un analito por ensayo, por lo que se requerían varias corridas para detectar todos los componentes de una muestra, tomaban mucho tiempo

y requerían de diferentes reactivos. Actualmente, ya se han desarrollado diversos inmunoensayos multi-analitos.

### ***Inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA)***

Otro tipo de inmunoensayo es aquel que, en lugar de utilizar una marca enzimática, emplea una marca quimioluminiscente. La quimioluminiscencia se define como la emisión de radiación electromagnética causada por una reacción química que produce luz. Los inmunoensayos quimioluminiscentes (CLIA) combinan la técnica quimioluminiscente con las reacciones inmunoquímicas y determinan la concentración de un analito en una muestra de acuerdo con la intensidad de luminiscencia que una reacción química produce (Wang et al., 2012). Este tipo de ensayo es muy parecido a otros ensayos con marcas isotópicas (RIA) o no isotópicas (ELISA), pero en este caso el anticuerpo que se emplea se marca con un químico que al reaccionar genera una emisión de luz, la cual es detectada por un sistema óptico. Los sustratos más utilizados en esta técnica son el luminol, isoluminol y sus derivados, pirogalol, derivados del ester de acridino o rutenio, entre otros. En esta técnica, también se usan enzimas para marcar las proteínas, siendo las más comunes la fosfatasa alcalina y la peroxidasa del rábano, las cuales, en presencia de compuestos oxidantes como el peróxido de hidrógeno, el oxígeno o el hipoclorito emiten luz durante la reacción de oxidación. Los CLIA se han utilizado en las últimas décadas para detectar analitos cuyas concentraciones son extremadamente bajas, como drogas, marcadores serológicos y hormonas (límite de detección = zeptomolas  $10^{-21}$  mol) (Cinquanta et al., 2017). Con el avance de la biología molecular, la nanotecnología y los biosensores se han desarrollado nuevos sistemas de inmunoensayos quimioluminiscente que permiten la cuantificación de diversos analitos al mismo tiempo en una sola muestra, mediante el uso de chips con un sistema de detección multiplex (Cinquanta et al., 2017; Wang et al., 2012). Esto reduce los tiempos de análisis y reduce también la cantidad de muestra inicial que se requiere para el proceso.

### **Espectrofotometría de masas**

La espectrometría de masas mide la masa molecular del compuesto por analizar, su estructura o simplemente su presencia y concentración. Esta técnica se basa en fragmentar las moléculas del compuesto para posteriormente separarlas y medirlas en función de su relación masa/carga (Rodríguez, 2011). Es el mejor método para la cuantificación de esteroides conjugados ya que tiene

una alta especificidad y precisión. Varios estudios han demostrado que usar tanto la cromatografía de gases o líquida en conjunto con la espectrofotometría de masas aumenta la sensibilidad y la especificidad de la cuantificación (Martínez et al., 2014; Wang et al., 2015). Otra ventaja de esta técnica es que varios esteroides pueden ser cuantificados en una misma muestra de suero. Sin embargo, estas técnicas, no son accesibles para los laboratorios de rutina debido al alto costo del instrumental y reactivos, así como la necesidad de personal altamente calificado y el consumo de tiempo en los procesos.

### **Consideraciones generales para la cuantificación de hormonas sexuales**

La mayoría de las hormonas involucradas con los procesos reproductivos, se secretan de manera pulsátil, rítmica y generalmente tienen una rápida respuesta ante estímulos endógenos propios del individuo. (Barbieri, 2014; Rodríguez, 2011). Esto quiere decir que su concentración presenta variaciones a lo largo del día o dependiendo de la etapa del ciclo menstrual/estral. Por lo que es recomendable que para cualquier análisis de concentración se considere tomar la muestra a la misma hora del día y considerar la fase del ciclo en la que se encuentra el sujeto de estudio. También se recomienda hacer un *pool* de muestras seriadas. A su vez otros factores que pueden tener una incidencia en la variación de la concentración de las hormonas circulantes pueden ser: edad, sexo, estado físico, presencia de embarazo, lactancia, menopausia, estrés, fiebre, presencia de alguna patología, ingestión de alimentos, tratamientos farmacológicos y ayuno, entre otras (Rodríguez, 2011). También es importante considerar la estructura química de la hormona a cuantificar. En el caso de algunas hormonas esteroides que son de origen lipídico, generalmente se encuentra en el suero unidas a globulinas específicas que muchas veces no son debidamente reconocidas por el anticuerpo. Por lo anterior, es recomendable que se realice un paso previo a la cuantificación con extracción orgánica. Por todo lo anterior, es relevante mencionar que cada laboratorio ya sea clínico o de investigación, debe establecer sus propias normas y protocolos para poder minimizar la variabilidad en la cuantificación de hormonas debida a este tipo de factores ajenos a la concentración propia de la muestra (Rodríguez, 2011).

### **Agradecimientos**

Los autores agradecemos a la Psic. Gema Estudillo Mendoza por su apoyo en el laboratorio para la

tinción de las citologías vaginales de las ratas. Agradecemos también al Dr. Octavio Mejía por la toma de las fotografías que incluimos en este trabajo. Asimismo, extendemos nuestro agradecimiento al Lic. en Artes Visuales Emiliano Mondragón por la edición de la figura y fotografías.

### **Conflicto de intereses**

Ninguno.

### **Derechos éticos para el uso de animales**

Los experimentos con animales se adhirieron a las directrices del ARRIVE y se realizaron de acuerdo a la guía sobre el cuidado y utilización de animales de laboratorio de los Institutos Nacionales de Salud de Estados Unidos (NIH no: 8023, revised 1978).

## **REFERENCIAS**

- Albertini, D. F. (2015). The Mammalian Oocyte. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction: Two-Volume Set* (Vol. 1). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00002-8>
- Allen, E., & Doisy, E. A. (1923). An ovarian hormone. *Journal of the American Medical Association*, *81*(21), 1808. <https://doi.org/10.1001/jama.1923.02650210074033>
- Antonov, A. L. (2017). Application of exfoliative vaginal cytology in clinical canine reproduction – a review. *Bulgarian Journal of Veterinary Medicine*, *20*(3), 193–203. <https://doi.org/10.15547/bjvm.997>
- Aydin, S. (2015). A short history, principles, and types of ELISA, and our laboratory experience with peptide/protein analyses using ELISA. *Peptides*, *72*, 4–15. <https://doi.org/10.1016/j.peptides.2015.04.012>
- Barbieri, R. L. (2014). The endocrinology of the menstrual cycle. In Z. Rosenwaks & P. M. Wassarman (Eds.), *Human Fertility* (Vol. 1154, Issue April 2014). Springer New York. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-0659-8>
- Bekyürek, T., Lima, N., & Bayra, G. (2002). Diagnosis of sexual cycle by means of vaginal smear method in the chinchilla (*Chinchilla lanigera*). *Laboratory Animals*, *36*(1), 51–60. <https://doi.org/10.1258/0023677021911768>
- Berson, B. S. A., & Yalow, R. S. (1959). Quantitative aspects of the reaction between insulin and

- insulin-binding antibody. *The Journal of Clinical Investigation*, 38(11), 1996–2016.
- Cinquanta, L., Fontana, D. E., & Bizzaro, N. (2017). Chemiluminescent immunoassay technology: what does it change in autoantibody detection? *Autoimmunity Highlights*, 8(1). <https://doi.org/10.1007/s13317-017-0097-2>
- Cora, M. C., Kooistra, L., & Travlos, G. (2015). Vaginal Cytology of the Laboratory Rat and Mouse: Review and Criteria for the Staging of the Estrous Cycle Using Stained Vaginal Smears. *Toxicologic Pathology*, 43(6), 776–793. <https://doi.org/10.1177/0192623315570339>
- De Tomasi, J. B., Crespo, A. A., & Crespo, A. F. (2012). Desarrollo folicular en el ovario. *Revista Salud Quintana Roo*, 5(19), 12–18. <https://www.imbiomed.com.mx/articulo.php?id=82826>
- Dorgan, J. F., Fears, T. R., McMahon, R. P., Aronson Friedman, L., Patterson, B. H., & Greenhut, S. F. (2002). Measurement of steroid sex hormones in serum: A comparison of radioimmunoassay and mass spectrometry. *Steroids*, 67(3–4), 151–158. [https://doi.org/10.1016/S0039-128X\(01\)00147-7](https://doi.org/10.1016/S0039-128X(01)00147-7)
- Dowsett, M., & Folkerd, E. (2005). Deficits in plasma oestradiol measurement in studies and management of breast cancer. *Breast Cancer Research*, 7(1), 1–4. <https://doi.org/10.1186/bcr960>
- Duffy, D. M., Ko, C., Jo, M., Brannstrom, M., & Curry, T. E. (2019). Ovulation: Parallels with inflammatory processes. *Endocrine Reviews*, 40(2), 369–416. <https://doi.org/10.1210/er.2018-00075>
- Evans, H. M., & Long, J. A. (1922). Characteristic Effects upon Growth, Oestrus and Ovulation Induced by the Intraperitoneal Administration of Fresh Anterior Hypophyseal Substance. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 8(3), 38–39. <https://doi.org/10.1073/pnas.8.3.38>
- Falender, A. E., Shimada, M., Lo, Y. K., & Richards, J. A. S. (2005). TAF4b, a TBP associated factor, is required for oocyte development and function. *Developmental Biology*, 288(2), 405–419. <https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2005.09.038>
- Farage, M. A., Miller, K. W., & Sobel, J. D. (2010). Infectious Diseases : Research and Treatment Dynamics of the Vaginal Ecosystem-Hormonal Influences. *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 3, 1–15.

- Faupel-Badger, J. M., Fuhrman, B. J., Xu, X., Falk, R. T., Keefer, L. K., Veenstra, T. D., Hoover, R. N., & Ziegler, R. G. (2010). Comparison of liquid chromatography-tandem mass spectrometry, RIA, and ELISA methods for measurement of urinary estrogens. *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *19*(1), 292–300. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-09-0643>
- Fitzpatrick, S. L., & Richards, J. A. S. (1994). Identification of a cyclic adenosine 3', 5'-monophosphate-response element in the rat aromatase promoter that is required for transcriptional activation in rat granulosa cells and R2C leydig cells. *Molecular Endocrinology*, *8*(10), 1309–1319. <https://doi.org/10.1210/mend.8.10.7854348>
- Frederick, J. L., Shimanuki, T., & DiZerega, G. S. (1984). Initiation of angiogenesis by human follicular fluid. *Science*, *224*, 389–390.
- Fujii, T., Hoover, D. J., & Channing, C. P. (1983). Changes in inhibin activity, and progesterone, oestrogen and androstenedione concentrations, in rat follicular fluid throughout the oestrous cycle. *Journal of Reproduction and Fertility*, *69*(1), 307–314. <https://doi.org/10.1530/jrf.0.0690307>
- Goldman, J. M., Murr, A. S., & Cooper, R. L. (2007). The rodent estrous cycle: Characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Research Part B - Developmental and Reproductive Toxicology*, *80*(2), 84–97. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20106>
- Halasz, M., & Szekeres-Bartho, J. (2013). The role of progesterone in implantation and trophoblast invasion. *Journal of Reproductive Immunology*, *97*(1), 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.jri.2012.10.011>
- Han, Y., Jiang, T., Shi, J., Liu, A., Liu, L. (2023) Review: Role and regulatory mechanism of inhibin in animal reproductive system. *Theriogenology*, *202*, 10-20. <https://doi.org/10.1016/j.theriogenology.2023.02.016>
- Hansen, K. R., Eisenberg, E., Baker, V., Hill, M. J., Chen, S., Talken, S., Diamond, M. P., Legro, R. S., Coutifaris, C., Alvero, R., Robinson, R. D., Casson, P., Christman, G. M., Santoro, N., Zhang, H., & Wild, R. A. (2018). Midluteal progesterone: A marker of treatment outcomes in couples with unexplained infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, *103*(7), 2743–2751. <https://doi.org/10.1210/jc.2018-00642>

- Ingram, B. D. L. (1959). *The vaginal smear of the senile laboratory rats*.
- Kaushik, T., Mishra, R., Singh, R. K., & Bajpai, S. (2020). Role of connexins in female reproductive system and endometriosis. *Journal of Gynecology Obstetrics and Human Reproduction*, 49(6), 101705. <https://doi.org/10.1016/j.jogoh.2020.101705>
- Le, J., Thomas, N., & Gurvich, C. (2020). Cognition, the menstrual cycle, and premenstrual disorders: A review. *Brain Sciences*, 10(4), 1–14. <https://doi.org/10.3390/brainsci10040198>
- Lee, E. B., Praveen Chakravarthi, V., Wolfe, M. W., & Karim Rumi, M. A. (2021). ER $\beta$  regulation of gonadotropin responses during folliculogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(19). <https://doi.org/10.3390/ijms221910348>
- Lefièvre, L., Conner, S. J., Salpekar, A., Olufowobi, O., Ashton, P., Pavlovic, B., Lenton, W., Afnan, M., Brewis, I. A., Monk, M., Hughes, D. C., & Barratt, C. L. R. (2004). Four zona pellucida glycoproteins are expressed in the human. *Human Reproduction*, 19(7), 1580–1586. <https://doi.org/10.1093/humrep/deh301>
- Liu, C. F., Barsoum, I., Gupta, R., Hofmann, M. C., & Yao, H. H. (2009). Stem cell potential of the mammalian gonad. *Frontiers in bioscience (Elite edition)*, 1(2), 510–518. <https://doi.org/10.2741/e47>
- Martínez, D., Correa Vidal, M., Oropesa, R., & González, O. (2014). Cuantificación simultánea de andrógenos, estrógenos, corticoides y pregnanos mediante cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. *Revista Cubana de Farmacia*, 48(4), 550–561. <http://scielo.sld.cuhttp://scielo.sld.cu>
- Mishra, B., Park, Y. J., Wilson, K., & Jo, M. (2015). X-linked lymphocyte regulated gene 5c-like (Xlr5c-like) Is a Novel Target of Progesterone Action in Granulosa Cells of Periovarian Rat Ovaries. *Physiology & Behavior*, 5, 226–238. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.05.008>
- Owen, J. A. (1975). Physiology of the menstrual cycle. *American Journal of Clinical Nutrition*, 28(4), 333–338. <https://doi.org/10.1093/ajcn/28.4.333>
- Paccola, C. C., Resende, C. G., Stumpp, T., Miraglia, S. M., & Cipriano, I. (2013). The rat estrous cycle revisited: a quantitative and qualitative analysis. *Anim. Reprod*, 10(4), 677–683.
- Pangas, S. A., & Rajkovic, A. (2015). Follicular development. In J. D. Knobil, E. and Neill (Ed.),

- Physiology of reproduction* (Fourth Edi, pp. 947–995). Academic Press Inc.
- Reddy, P., Liu, L., Adhikari, D., Jagarlamudi, K., Rajareddy, S., Shen, Y., Du, C., Tang, W., Hämäläinen, T., Peng, S. L., Lan, Z. J., Cooney, A. J., Huhtaniemi, I., & Liu, K. (2008). Oocyte-specific deletion of pten causes premature activation of the primordial follicle pool. *Science*, *319*(5863), 611–613. <https://doi.org/10.1126/science.1152257>
- Richards, J. S. (1980). Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones on follicular cell differentiation. *Physiological Reviews*, *60*(1), 51–89. <https://doi.org/10.1152/physrev.1980.60.1.51>
- Richards, J. (2018). The ovarian cycle. In G. Litwacł (Ed.), *Vitamins and Hormones* (First edit, pp. 1–18). Academic Press.
- Rodriguez, A. (2011). *Libro laboratorio clinico y la funcion hormonal* (C. Catro Fernández, L. Rodelgo Jiménez, M. A. Ruis Ginés, & G. Ruíz Martín (eds). Asociación Castellano-Manchega de Análisis Clínicos.
- Rosales Torres, A. M., & Sánchez Guzmán, A. (2008). Apoptosis en la atresia folicular y la regresión del cuerpo lúteo. Revisión. *Tecnica Pecuaria En Mexico*, *46*(2), 159–182.
- Shorr, E. (1928). A new technic for staining vaginal smears. *Science*, *68*(1752), 87–88. <https://doi.org/10.1126/science.68.1752.87>
- Srisuparp, S., Strakova, Z., & Fazleabas, A. T. (2001). The Role of Chorionic Gonadotropin (CG) in Blastocyst Implantation. *Archives of Medical Research*, *32*, 627–634. [https://doi.org/10.1016/s0188-4409\(01\)00330-7](https://doi.org/10.1016/s0188-4409(01)00330-7)
- Stanczyk, F. Z., Cho, M. M., Endres, D. B., Morrison, J. L., Patel, S., & Paulson, R. J. (2003). Limitations of direct estradiol and testosterone immunoassay kits. *Steroids*, *68*(14), 1173–1178. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2003.08.012>
- Stanczyk, F. Z., Lee, J. S., & Santen, R. J. (2007). Standardization of steroid hormone assays: Why, how, and when? *Cancer Epidemiology Biomarkers and Prevention*, *16*(9), 1713–1719. <https://doi.org/10.1158/1055-9965.EPI-06-0765>
- Stockard, C. R., & Papanicolaou, G. N. (1917). A rhythmical “heat period” in the guinea-pig. *Science*, *XLVI*(1176), 42–44.

- Tan, X., David, A., Day, J., Tang, H., Dixon, E. R., Zhu, H., Chen, Y.-C., Khaing Oo, M. K., Shikanov, A., & Fan, X. (2018). Rapid Mouse Follicle Stimulating Hormone Quantification and Estrus Cycle Analysis Using an Automated Microfluidic Chemiluminescent ELISA System. *ACS Sensors*, 3(11), 2327–2334. <https://doi.org/10.1021/acssensors.8b00641>
- Taraborrelli, S. (2015). Physiology, production and action of progesterone. *Acta Obstetrica et Gynecologica Scandinavica*, 94, 8–16. <https://doi.org/10.1111/aogs.12771>
- Toral Delgado, L. (2017). *Identificación del ciclo estral*. BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA.
- Wang, C., Wu, J., Zong, C., Xu, J., & Ju, H. X. (2012). Chemiluminescent immunoassay and its applications. *Fenxi Huaxue/ Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 40(1), 3–10. [https://doi.org/10.1016/S1872-2040\(11\)60518-5](https://doi.org/10.1016/S1872-2040(11)60518-5)
- Wang, Q., Bottalico, L., Mesaros, C., & Blair, I. A. (2015). Analysis of estrogens and androgens in postmenopausal serum and plasma by liquid chromatography–mass spectrometry. *Steroids*, 99(1), 76–83. <https://doi.org/10.1016/j.steroids.2014.08.02>
- Wuttke, W., Pitzel, L., Seidlová-Wuttke, D., & Hinney, B. (2001). LH pulses and the corpus luteum: The luteal phase deficiency (LPD). *Vitamins and Hormones*, 63, 131–158. [https://doi.org/10.1016/s0083-6729\(01\)63005-x](https://doi.org/10.1016/s0083-6729(01)63005-x)
- Yen, S. S. C., Jaffe, R. B., & Barbieri, R. L. (2019). *Reproductive Endocrinology: physiology, pathology, and clinical management* (J. Strauss & R. Barberi (eds.)). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/C2015-0-05642-8>
- Zelevnik, A. J., & Plant, T. M. (2015). Control of the Menstrual Cycle. In *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction* (Fourth Edi, Vol. 2, pp. 1307–1361). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-397175-3.00028-4>