

22
20je



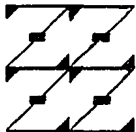
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EFFECTOS AGUDOS Y CRONICOS DE LA SECCION DEL NERVIO
OVARICO SUPERIOR SOBRE LA CONCENTRACION DE
CATECOLAMINAS EN EL OVARIO DE LA RATA PREPUBER

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A :
MA. EUGENIA GONZALEZ ARANGO



LO HUMANO
EJE
DE NUESTRA REFLEXION

Director de Tesis:
DRA. REBECA CHAVEZ GENARO

MEXICO, D. F.

JULIO, 1994

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES "ZARAGOZA"

**EFFECTOS AGUDOS Y CRONICOS DE LA SECCION DEL NERVIIO
OVARICO SUPERIOR SOBRE LA CONCENTRACION DE
CATECOLAMINAS EN EL OVARIO DE LA RATA PREPUBER**

Tesis para obtener el título de :

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A: Ma. Eugenia González Arango

Director de tesis: Dra.Rebeca Chávez Genaro

Esta tesis fue realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza UNAM.

Durante el desarrollo de la tesis se contó con el apoyo financiero de DGAPA (convenio IN 210893).

La verdad, os hará libres.

Jn. 8,32

A mis padres:

Rosa y Tomás con respeto y cariño.

A mis hermanos:

Lupita y Tomás Jr. por lo mucho que los amo.

A Tina y Cristy por su apoyo incondicional
Gracias

A los seres que partieron y me dieron su amor infinito.
Costita y Nila.

Agradecimientos

Agradezco al Dr. Roberto Domínguez Casalá la oportunidad que me brindó para seguirme superando, a sí mismo a la Dra Rebeca Chávez Genaro por asesorarme y confiar siempre en mí, espero no defraudarlos.

A los miembros del jurado:

Q.F.I. Leonor Aguilar Santelises
Dra. Rebeca Chávez Genaro
Q.F.B. Patricia Parra Cervantes
M. en IBSH. Leticia Morales Ledesma
I.B.Q. Victor Corvera Pillado

Por su valiosa ayuda en la revisión de esta tesis y sus sugerencias tan acertadas.

Gracias a cada uno de mis amigos y amigas del Laboratorio de Biología de la Reproducción por su respeto y ayuda en todo momento.

Al hombre que me enseñó el precio del éxito
Miguel Roberto.

A Lety por ser mi amiga, gracias.

A Nico una amistad que no tiene límites.

A Rubén por el trabajo que compartimos.

I N D I C E

I.	RESUMEN.....	1
II.	INTRODUCCION.....	3
III.	FUNDAMENTACION DEL TEMA.....	5
	a.- El animal prepúber como modelo de estudio.....	8
	b.- Metabolismo de las catecolaminas.....	9
	Estructura	
	Origen	
	Mecanismo de Acción	
	c.- Principios de CLAR.....	12
	Generalidades de Cromatografía	
	Parámetros Cromatográficos	
IV.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
V.	OBJETIVOS.....	17
VI.	HIPOTESIS.....	17
VII.	MATERIALES Y METODO.....	18
VIII.	RESULTADOS.....	22
IX.	DISCUSION.....	28
X.	CONCLUSIONES.....	31
XI.	BIBLIOGRAFIA.....	32
XII.	APENDICES.....	36

I. RESUMEN

En este trabajo se presentan los resultados del estudio de los efectos de la Sección unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior (NOS) sobre el contenido y la concentración de catecolaminas ováricas, en ratas de la cepa CIIZ-V de 16 y 32 días de edad, sacrificadas en agudo (24 ó 72 h) o largo plazo (primer estro vaginal observado [PEV]), después de la desnervación. Para la cuantificación de catecolaminas se utilizó el método de cromatografía líquida de alta resolución (CLAR).

La única catecolamina detectada en el ovario del animal prepúber fue la noradrenalina. En los animales testigo, el contenido y concentración de la catecolamina aumentó con respecto a la edad estudiada. No se observaron diferencias significativas entre el ovario izquierdo y derecho.

En los animales desnervados y sacrificados 24 horas después, la sección del NOS izquierdo se tradujo en una disminución del contenido de noradrenalina en el ovario desnervado con respecto al control (0.23 ± 0.11 vs 1.63 ± 0.22 , $P < 0.05$), mientras que el contenido del neurotransmisor en el ovario inervado de los animales de 16 días, aumenta a casi el triple (3.63 ± 0.46 vs 1.30 ± 0.71 , $P < 0.05$), mientras que en los de 32, no se observa este comportamiento. En los animales con sección del NOS derecho, a los 16 días, las concentraciones del neurotransmisor en el ovario desnervado se vuelven no detectables, por los medios de análisis utilizados y el inervado presenta una concentración semejante a la de los animales sometidos a operación simulada. En los de 32 días, también se observó una disminución del contenido de noradrenalina, pero menos brusco. La sección bilateral provocó reducción del contenido de noradrenalina en ambos ovarios.

En los grupos de animales sacrificados 72 horas después de la desnervación, se observaron resultados semejantes, en cuanto a la reducción del contenido de noradrenalina en el ovario desnervado, sin embargo, no se observaron compensaciones significativas por el ovario que

mantuvo intacta su inervación. Los animales operados en el período juvenil (16 días), presentaron efectos agudos más drásticos que los de 32 días de edad.

Los animales desnervados, sacrificados al primer estro vaginal, presentaron reducción significativa del contenido de noradrenalina, respecto al testigo.

Nuestros resultados confirman que el Nervio Ovárico Superior es la principal fuente de inervación catecolaminérgica al ovario y que su eliminación provoca modificaciones sobre el contenido de noradrenalina, que dependen tanto de la edad en que se realice la desnervación, como del período postoperatorio.

II. INTRODUCCION

El ovario es una glándula par ubicada en la parte superior de la cavidad pélvica, cuyas funciones son la producción de ovocitos y hormonas (1). Esta glándula, posee tres compartimentos funcionales; el intersticial, el folicular y el luteal, cuya función está regulada por interacciones entre las gonadotropinas, las hormonas ováricas (estrógenos, progesterona, andrógenos, inhibina, hormona liberadora de las gonadotropinas y otros polipéptidos de origen ovárico), las catecolaminas y otros neurotransmisores (1, 2, 3, 4, 5, 6).

Las gonadotropinas son glicoproteínas que contienen una cadena beta hormona específica y una cadena alfa especie específica. Son secretadas por la adenohipófisis se conocen con el nombre de hormona estimulante del folículo (FSH) y hormona luteinizante (LH). La síntesis y liberación de ambas gonadotropinas están reguladas por la hormona liberadora de las gonadotropinas (LHRH o GnRH). La GnRH es un decapeptido que es sintetizado por neuronas del hipotálamo, liberado dentro de los vasos porta hipofisarios y transportado a la adenohipófisis donde estimula la síntesis y liberación de las gonadotropinas (2, 4, 7, 8, 9, 10).

La síntesis y liberación de la LHRH es a su vez modulada por hormonas esteroideas que actúan directamente sobre neuronas LHRHérgicas o sobre otras neuronas que

modulan la actividad de las anteriores. Los eventos en cascada que guían la secreción de LH son iniciados por el aumento de la secreción de 17-beta estradiol por el ovario, el cuál dispara la secreción de LHRH y aumenta la respuesta de las gonadotropinas hipofisiarias a la LHRH (10).

Estudios recientes indican que las catecolaminas pueden mediar una variedad de procesos atribuidos, a una interacción directa entre las gonadotropinas y las hormonas gonadales presentes . Tales como el crecimiento folicular, la ciclicidad, la ovulación, la síntesis de progesterona y la hipertrofia compensadora del ovario (11, 12, 13, 14, 15, 16).

En este trabajo se plantea el estudio de los efectos de la desnervación catecolaminérgica del ovario por la sección del Nervio Ovárico Superior, sobre el contenido de catecolaminas ováricas, en período agudo o crónico, utilizando como modelo de estudio a la rata en etapa infantil y juvenil.

III. FUNDAMENTACION DEL TEMA

Inervación del ovario

Estudios anatómicos e histológicos describen que la inervación del ovario en los mamíferos es de tipo adrenérgico, colinérgico y peptidérgico (17, 18, 19). Las fibras parasimpáticas derivan probablemente del nervio vago, mientras que la inervación simpática se origina en la región torácica baja de la médula espinal, probablemente a nivel de los segmentos torácicos 10 y 11 (T10, T11), finalmente, vía el plexo celiaco y el ganglio ovárico, la inervación penetra al ovario por el hilio (18, 19, 20).

La inervación simpática del ovario es principalmente de tipo noradrenérgica. Estas fibras noradrenérgicas inervan no solamente el tejido intersticial de la glándula, sino también a la teca externa (17).

El ovario de la rata posee inervación adrenérgica abundante. Los nervios adrenérgicos post-ganglionares llegan al ovario por dos rutas separadas : el plexo ovárico y el ligamento suspensorio por el cual viaja el Nervio Ovárico Superior [NOS] (20) [Fig 1].

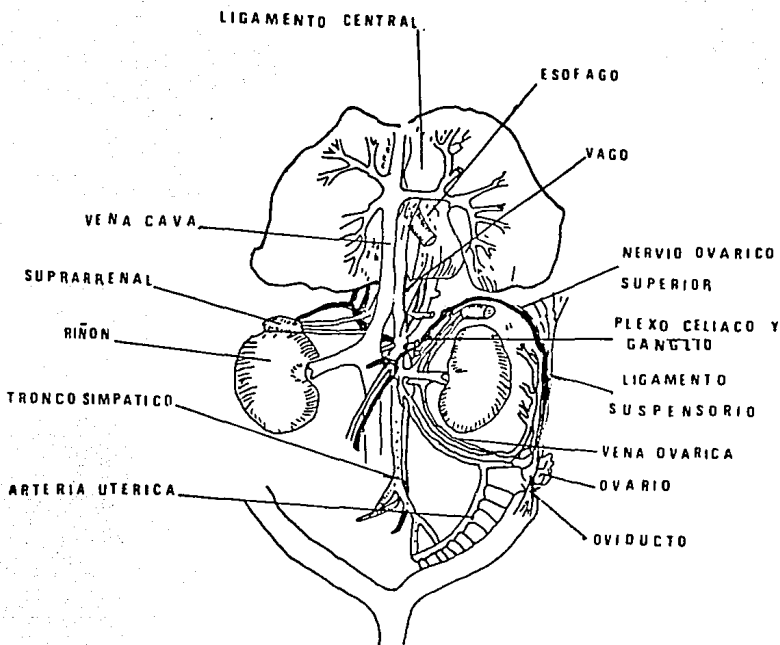


Fig. 1 REPRESENTACION DEL CURSO DEL NERVIO OVARIO SUPERIOR EN EL LIGAMENTO SUSPENSORIO. Tomada de Lawrence y Burden (20).

El ovario no depende exclusivamente de la inervación extrínseca como abastecimiento final de catecolaminas, se sabe que el sistema nervioso adrenérgico presenta varios tipos de células con una capacidad completa para una síntesis independiente de catecolaminas (21). Las células cromafines en la médula adrenal los cuerpos paraópticos y los ganglios periperaleos realizan en conjunto la síntesis de catecolaminas (21).

Además de las terminales nerviosas catecolaminérgicas, el ovario presenta receptores específicos del subtipo beta dos, los cuales están presentes en la células de la granulosa y de la teca externa (22). Durante la pubertad, los receptores beta adrenérgicos se ven incrementados entre el período juvenil tardío y la mañana del primer proestro y disminuyen a las 16:00 de ese día, los valores más bajos se presentan para el primer día del estro (22).

Durante el período juvenil, además de las variaciones en el contenido de los receptores beta-adrenérgico, se ha observado aumento en la concentración de la noradrenalina (23). Esto ha llevado a examinar con gran detalle la ontogenia de las catecolaminas y sus receptores en los diferentes períodos de desarrollo de la rata, así como a analizar las posibles interacciones de éstas con el desarrollo de la función ovárica (27, 28, 30, 33, 45) .

El animal prepúber como modelo de estudio

La pubertad se define como la fase biológica que une a la inmadurez con la madurez sexual y es el resultado de una serie de eventos neuroendócrinos que ocurren en el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas, las cuales culminan en el inicio la función reproductiva (24, 25, 26). El inicio de la pubertad esta determinado genéticamente y varia con la especie, en la rata se presenta entre los 35 y 45 días de edad, según la cepa de estudio (24).

La participación de la inervación noradrenérgica del ovario en la regulación de la pubertad y la primera ovulación, ha sido estudiada por medio de los efectos que producen la eliminación o la estimulación de las terminales noradrenérgicas (6, 22, 27, 28, 29). Así, la administración de hormona de suero de yegua preñada [PMSG], a ratas de 28 días de edad provoca depleción del contenido de noradrenalina ovárica, aumento del peso de los ovarios y ovulación, 12 horas después de su administración (31). En condiciones fisiológicas, la depleción de noradrenalina ovárica se correlaciona con aumento de la concentración sérica de gonadotropinas (32). En animales sin tratamiento, se observa aumento gradual de la concentración de noradrenalina ovárica del día 28 al 31 de vida, lo que se puede correlacionar con un estadio de maduración del ovario hormonalmente independiente, ya que con excepción de

la prolactina, los esteroides y las hormonas hipofisiarias permanecen relativamente constantes (23).

Existen numerosos hechos experimentales que permiten suponer la existencia de lateralización en los mecanismos centrales y periféricos que regulan la función del ovario y que éstos además dependen de la edad en que el animal sea sometido a dichas manipulaciones (33, 34, 35). Así por ejemplo cuando el animal prepúber es sometido a la sección unilateral del nervio ovárico superior, la cuota ovulatoria del ovario desnervado disminuye y aumenta la del inervado. En los animales con sección bilateral del nervio ovárico superior no se observa este comportamiento. Los cambios en el número de ovocitos liberados se acompaña de modificaciones en el peso de los ovarios (29). Así también en los animales con Sección del Nervio Ovárico Derecho el peso del ovario se reduce, en cambio cuando se secciona el nervio del lado izquierdo, el ovario desnervado no se ve afectado en su peso y el intacto lo incrementa (29). Datos que han permitido sugerir que el Nervio Ovárico Superior participa en la regulación de la ovulación y la existencia de lateralización de los mecanismos de regulación del ovario.

Metabolismo de catecolaminas

Estructura. Las Catecolaminas están estructuralmente

emparentadas con un grupo de compuestos orgánicos designados como catecoles. El nombre del grupo es una contracción del término original que era pirocatecol (1,2-dihidroxibenceno). Las hormonas médulo-suprarrenales están categorizadas clínicamente como catecolaminas las cuales derivan del aminoácido tirosina, constituyendo una familia de mensajeros intercelulares, los cuales actúan en la transferencia de información simpática como neurotransmisores, también actúan como moduladores neurohormonales o como hormonas (36, 37) .

Origen. La vía de síntesis de catecolaminas está dada por la conversión de tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA) enzimáticamente catalizada por la tirosina hidroxilasa, posteriormente la DOPA es convertida en dopamina, la reacción es catalizada por una descarboxilasa. La dopamina se almacena entonces en vesículas (gránulos cromafines) detectables en la células de la médula adrenal, al igual que en neuronas del sistema simpático. Estas vesículas contienen dopamina-beta hidroxilasa, que cataliza la conversión de dopamina en noradrenalina. La última etapa es catalizada por la feniletanolamina-N-metiltransferasa (enzima citoplasmática), de manera que la noradrenalina debe salir de la vesícula para ser transformada en adrenalina y reingresar como tal a los gránulos de secreción (38) [Fig. 2].

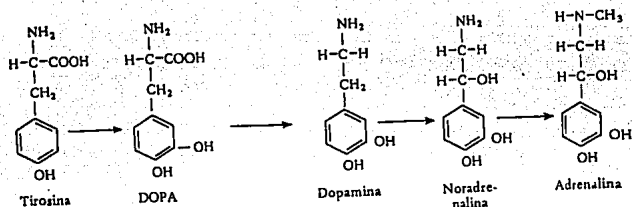


Fig.2. Biosíntesis de las catecolaminas. Tomada de White (37)

La liberación del contenido de las vesículas puede ser desencadenado por impulsos nerviosos que determinan el ingreso de Calcio [Ca^{2+}], a la célula. La vesícula se desplaza hacia la membrana plasmática, se fusiona con ella y se abren entonces al exterior, descargando su contenido (39).

La síntesis de catecolaminas es regulada por retroalimentación negativa. La adrenalina y noradrenalina inhiben alostéricamente a la tirosina hidroxilasa, la cual es la enzima que limita la velocidad de la reacción en la conversión de tirosina a 3,4-dihidroxifenilalanina (39).

Mecanismo de acción. La noradrenalina y la adrenalina se unen a receptores específicos de la membrana plasmática de las células efectoras. Se ha podido determinar la existencia de dos grupos de receptores, alfa y beta, cuya estimulación produce distintas respuestas. La unión de las hormonas u otras sustancias agonistas a receptores alfa desencadena respuestas como la constricción de esfínteres en estómago y vejiga urinaria, contracción de músculo uterino. A su vez los receptores alfa han sido divididos en alfa 1 y alfa 2. Los alfa 1 se encuentran en musculatura lisa arterial; los alfa 2, en terminales nerviosas, plaquetas y en vasos sanguíneos (36, 37). La fijación de las hormonas a receptores beta produce aumento de frecuencia cardíaca, de la contractilidad y velocidad de conducción en corazón, dilatación de vasos sanguíneos, disminución de la motilidad y tono del estómago, relajación del músculo uterino y de vejiga urinaria (38, 40).

Los efectos metabólicos que se describen son producidos por estimulación de estos receptores distribuidos de manera estratégica anatómica.

Principios de cromatografía de líquidos de alta resolución.

Generalidades de la cromatografía de líquidos. La Cromatografía de líquidos de alta resolución es un método

físico de separación, en el cual los componentes a separar se distribuyen entre dos fases; una de ellas, la fase estacionaria es un lecho fijo mientras que la otra la fase móvil, se desplaza por percolación a través del lecho. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los componentes a lo largo de la fase estacionaria, la separación se realiza gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los componentes de la muestra por la fase estacionaria y la fase móvil (41).

Una forma de clasificar la Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR), se basa en la naturaleza de la fase estacionaria y sus procesos de separación, lo que permite reconocer cuatro tipos

1. Cromatografía de Adsorción : La fase estacionaria es un adsorbente y la separación se realiza por repetidas etapas de adsorción y desorción de la muestra entre la fase estacionaria .

2. Cromatografía de Partición : La separación no se basa en la adsorción , sino en una verdadera partición entre la fase móvil y la estacionaria.

3. Cromatografía de Intercambio Iónico: El lecho estacionario tiene una superficie cargada iónicamente con carga contraria a la muestra que se va a separar. Esta técnica se utiliza únicamente con muestras ionizables. La

fase móvil es una solución amortiguadora en el que el pH y la polaridad de la muestra se utilizan para controlar el tiempo de elución .

4. Cromatografía de Exclusión : El empaquetamiento de la columna es un material poroso de dimensiones comprendidas en ciertos límites, con lo que la muestra es retenida o filtrada según su tamaño molecular. Esta técnica es igualmente conocida como Filtración en Gel o Cromatografía sobre Geles (41).

Parámetros Cromatográficos Principales. Dentro del trabajo Cromatográfico, es necesario disponer de términos que nos permitan expresar las respuestas cromatográficas de manera cualitativa y cuantitativa. Por lo que a continuación se describen dichos parámetros.

Parámetros del Volumen de Retención .- Al inyectar una muestra en la corrida de la fase móvil, ésta recorre el trayecto a través de la tubería y la columna cromatográfica saliendo por el otro extremo de la columna hasta llegar al detector. Si no existe interacción de la muestra con la columna , ésta saldrá de la misma a una velocidad similar a la de la fase móvil. Esto es, que saldrá de la columna cuando el volumen total de la fase móvil utilizado desde el instante de la inyección de la muestra sea igual al volumen intersticial (V_i). Si la muestra tiene

interacciones con la columna necesitará mayor volumen de fase móvil para salir, a este volumen se le denomina de retención (V_r). Ambos volúmenes nos permiten caracterizar el desplazamiento de las moléculas de interés y dado que al realizar el trabajo cromatográfico, la velocidad de la fase móvil permanece constante, es más práctico expresar los desplazamientos en función del tiempo; el primer tiempo se conoce como tiempo muerto (t_m) y el segundo como tiempo de retención de la muestra (t_r) (41).

La cromatografía de líquidos de alta resolución (CLAR) con detección electroquímica (EC) es ahora el método de elección para la determinación de catecolaminas (CA) e indolaminas (IA) en varios fluidos biológicos y tejidos. Se ha establecido que con la detección electroquímica se puede determinar monoaminas las cuales al estar presentes en cantidades del rango de nanogramos o de picogramos hace de esta determinación una de las más sencibles y útiles en la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución (46).

IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que la función de la gónada, está modulada por cambios neuroendócrinos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, los cuales varían en las diferentes fases del desarrollo del individuo y que además parecen ser lateralizados (3, 31, 33, 35). Por otra parte, dado que se ha demostrado una íntima relación entre las concentraciones de catecolaminas ováricas y el proceso ovulatorio (32), y que en los animales con sección unilateral del nervio ovárico superior se observa reducción o pérdida de la ovulación (29), en este trabajo se plantea el estudio de los efectos de la desnervación catecolaminérgica en el animal prepúber, sobre la concentración de noradrenalina ovárica en un período agudo (24 h o 72 h) y crónico al primer estro vaginal [PEV].

Para la determinación de catecolaminas presentes en el ovario de la rata prepúber, se utiliza un método de separación cuantitativo: la Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución, empleando un detector electroquímico capaz de determinar concentraciones muy pequeñas de catecolaminas del orden de nanogramos (46).

V. OBJETIVO

Analizar los efectos agudos y crónicos de la desnervación unilateral y bilateral del nervio ovárico superior sobre las concentraciones de catecolaminas en el ovario de ratas prepúberes.

VI. HIPOTESIS

El sistema catecolaminérgico del ovario, modula la reactividad de la gónada a las gonadotropinas. La eliminación del nervio ovárico superior como la principal fuente de inervación catecolaminérgica al ovario provocará modificaciones sobre la concentración de noradrenalina intraovárica que dependerán de la edad en que se realice la sección y del tiempo postevolución en el cual se observen los efectos de la desnervación.

VII. MATERIALES Y METODO

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV de 16, 32 de edad y (primer estro vaginal), mantenidas en condiciones controladas de iluminación (14h/10h luz-oscuridad, luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso al agua y al alimento. Los animales se distribuyeron en los siguientes grupos experimentales:

1) *Grupo Testigo Absoluto [TA]*. Ratas prepúberes sin tratamiento fueron revisadas diariamente hasta el momento de la apertura vaginal. A partir de ese momento se tomaron frotis vaginales diarios y fueron sacrificadas en la mañana del día que presentaron el primer estro vaginal.

Otro grupo de animales sin tratamiento fue sacrificado a los 16 y 32 días de edad.

2) *Grupo con Operación Simulada [OS]*. Grupos de 8 a 10 hembras de 16 y 32 días de edad, fueron anestesiadas con éter entre las 09:00 y las 11:00 h. Se colocaron en posición ventral y se les realizó una incisión que abarcó piel y músculo. Los animales fueron sacrificados 24 ó 72 horas después de la cirugía, o en el día del primer estro vaginal.

3) *Grupos con Sección unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior*. Los animales fueron anestesiados y laparotomizados como en el grupo con operación simulada. Se exteriorizó el ovario, izquierdo o derecho, se identificó el ligamento suspensorio correspondiente y se seccionó el

nervio ovárico superior izquierdo [SNOI] o derecho [SNOD]. El ovario se regreso a la cavidad abdominal y se suturó el músculo y la piel (29). En los animales con sección bilateral [SBNO], el proceso de desnervación fue el mismo pero ahora con sección de ambos nervios.

Durante la autopsia los ovarios fueron disecados, pesados y se mantuvieron congelados a -70°C , hasta el momento en que se realizó la cuantificación de catecolaminas.

Cuantificación de Catecolaminas.

La cuantificación de catecolaminas se realizó por Cromatografía de Líquidos de Alta Resolución [CLAR] (42), utilizando un sistema computarizado de recolección de datos, con condiciones cromatográficas óptimas. (Fig. 3)

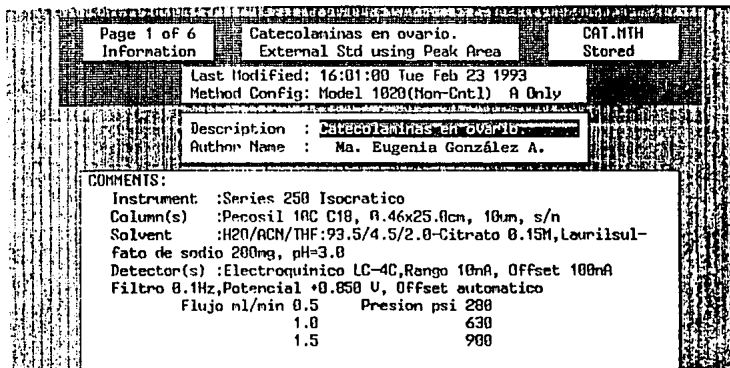


Fig 3 Formato de pantalla de las condiciones cromatograficas del equipo de integración modelo Nelson 1020.

La validación del método, se realizó utilizando concentraciones conocidas de los estándares de (Apéndice A) (Fig.4).

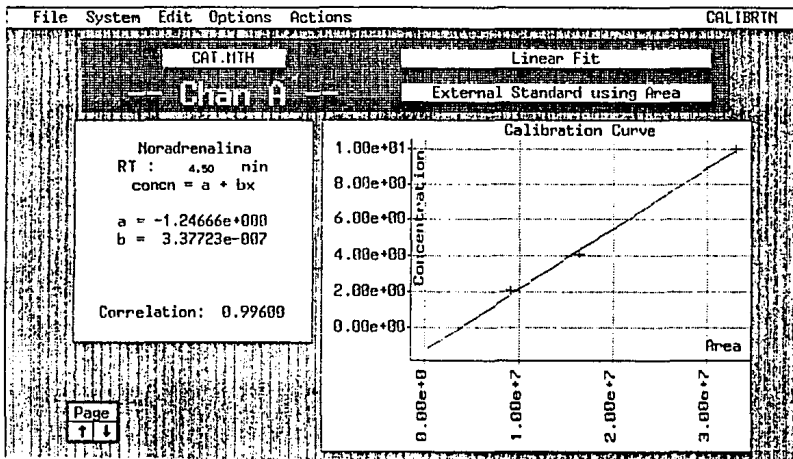


Fig.4 Diagrama de curva de calibración para Noradrenalina evaluado en el sistema de integración Nelson 1020.

.ls2

Los datos de contenido de catecolaminas fueron expresados en nanogramos totales y su concentración en nanogramos por miligramo de peso del órgano.

Tratamiento Estadístico .

Los resultados del peso del ovario, de la cantidad y concentración de catecolaminas fueron analizados por Análisis de Varianza, seguido por la prueba de Tukey. En todos los casos se considero que las diferencias fueron estadísticamente significativas cuando la diferencia fueron igual o menor al 5%.

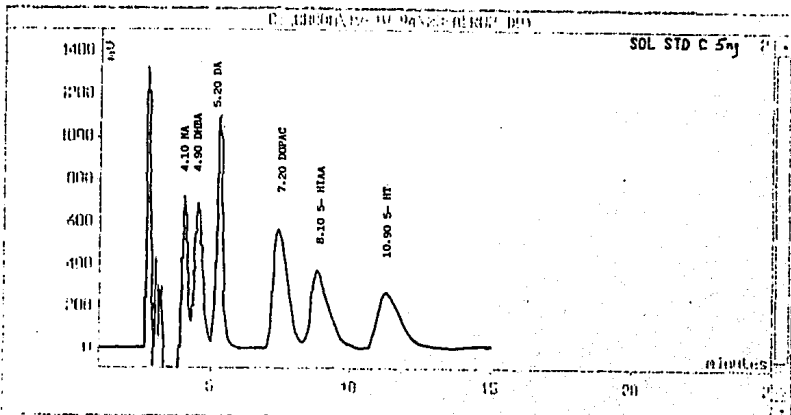
VIII. RESULTADOS

La única catecolamina detectada en el ovario fue la Noradrenalina, con un tiempo de retención de 4.10 min, el estándar interno (DHBA) se presentó a los 4.90 min. La corrida cromatográfica de los estándares mostró una buena separación de las catecolaminas, con tiempos de retención definidos (Tabla 1, Fig. 5).

Tabla 1.-Intervalo del tiempo de retención, media \pm e.e.m. de los tiempos de retención de estándares empleados en la determinación de catecolaminas (NA=Noradrenalina, DA=Dopamina, DHBA=Dihidroxi bencilamina, 5-HT= Serotonina).

Estándar	n	Intervalo (min.)	X \pm e.e.m.
NA	5	4.10-4.30	4.19 \pm 0.05
DHBA	5	4.85-4.90	4.89 \pm 0.05
DA	5	5.20-5.30	5.26 \pm 0.05
5-HT	5	10.50-11.50	11.00 \pm 0.31

Fig. 5. Cromatograma de estándares



El porcentaje de extracción por alúmina a que fueron sometidas las muestras, presentó una recuperación de las mismas entre el 50 y 60%.

Los animales testigo mostraron incremento de peso del ovario, del contenido y la concentración de la amina detectada en correlación con la edad del animal. No se observaron diferencias significativas de éstos parámetros entre el ovario izquierdo y derecho (Tabla 2).

Tabla 2.- Media \pm e.e.m. del peso (mg), del contenido (ng) y de la concentración (ng/mg) de noradrenalina en el ovario izquierdo (OI) o derecho (OD) de ratas intactas sacrificadas a los 16, 32 días o al primer estro vaginal (PEV).

Grupo	Ovario	n	Peso	Contenido	Concentración
16 días	OI	8	5.10 \pm 0.52	1.93 \pm 0.39	0.37 \pm 0.05
	OD	6	4.03 \pm 0.35	1.24 \pm 0.26	0.31 \pm 0.06
32 días	OI	8	11.02 \pm 0.70*	6.59 \pm 0.79*	0.59 \pm 0.05*
	OD	6	9.30 \pm 0.28*	5.99 \pm 1.16*	0.64 \pm 0.11*
PEV	OI	4	16.42 \pm 2.34*	7.56 \pm 1.91*	0.44 \pm 0.05
	OD	6	11.69 \pm 1.74	8.44 \pm 0.54	0.83 \pm 0.15

* P < 0.05 vs mismo ovario edad anterior estudiada

Los animales con operación simulada, no presentaron modificaciones significativas en ninguno de los parámetros estudiados, respecto al grupo control. Los datos de los animales desnervados son comparados con respecto a los de operación simulada, en cada una de las edades estudiadas.

Efectos de la desnervación aguda (24 hs).

La tabla 3 muestra los datos de animales sacrificados 24 horas después de las intervenciones quirúrgicas. En los animales de 16 días de edad, la sección del NOS Izquierdo provocó aumento de peso del ovario desnervado, efecto que estuvo acompañado por una disminución significativa en el contenido y concentración de noradrenalina. El ovario inervado no presentó cambios en el peso, pero el contenido del neurotransmisor fue 3 veces mayor. La sección del NOS derecho eliminó la presencia de noradrenalina en el ovario desnervado, sin cambios significativos en el inervado. No se observó presencia de la amina en los ovarios de los animales con sección de ambos nervios ováricos.

Los animales con sección del unilateral del NOS a los 32 días de edad, mostraron reducción del contenido de noradrenalina en el ovario desnervado. Cuando el nervio seccionado fue el izquierdo, el contenido del neurotransmisor en el ovario contralateral (derecho) también disminuyó. Los animales con sección bilateral presentaron aumento significativo de peso, con reducción del contenido de noradrenalina de casi el 90%.

Tabla 3.- Media \pm e.e.m. del peso (mg), del contenido (ng) y de la concentración (ng/mg) de noradrenalina en ovario izquierdo (OI) ó derecho (OD) de ratas de 16 ó 32 días sometidas operación simulada (OS) ó a desnervación unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior y sacrificadas 24 horas después del tratamiento.

16 días					
Grupo	Ovario	n	Peso	Contenido	Concentración
OS	OI	5	4.80 \pm 0.46	1.63 \pm 0.22	0.36 \pm 0.07
	OD	3	4.54 \pm 0.64	1.30 \pm 0.71	0.29 \pm 0.14
SNOI	OI	7	7.36 \pm 0.53*	0.23 \pm 0.11*	0.11 \pm 0.01*
	OD	8	5.03 \pm 0.36	3.63 \pm 0.46*a	0.74 \pm 0.09a
SNOD	OI	7	5.57 \pm 0.42	2.82 \pm 0.89	0.32 \pm 0.04
	OD	5	5.83 \pm 0.56	N.D *a	N.D. *a
SBNO	OI	4	6.58 \pm 0.71	N.D. *	N.D *
	OD	6	7.46 \pm 0.26*	N.D *	N.D. *
32 días					
OS	OI	6	9.76 \pm 0.61	5.53 \pm 0.52	0.57 \pm 0.05
	OD	6	9.19 \pm 0.75	5.56 \pm 0.60	0.62 \pm 0.06
SNOI	OI	5	11.13 \pm 1.31	N.D *	N.D *
	OD	6	9.62 \pm 1.07	3.98 \pm 0.42a	0.42 \pm 0.04a
SNOD	OI	3	11.70 \pm 1.60	6.15 \pm 2.72	0.49 \pm 0.16
	OD	3	10.17 \pm 0.68	2.09 \pm 0.27*a	0.18 \pm 0.03*a
SBNO	OI	5	21.22 \pm 3.04*	0.39 \pm 0.29*	0.09 \pm 0.02*
	OD	5	18.38 \pm 1.92*	0.58 \pm 0.49*	0.09 \pm 0.01*

N.D. No detectable; * P < 0.05 vs OS mismo ovario
a, P < 0.05 vs ovario izquierdo, mismo grupo

Efectos de la desnervación crónica (72 hs).

En los animales intervenidos a los 16 días de edad, la sección del NOS Izquierdo, provocó reducción significativa del contenido de noradrenalina del ovario desnervado, mientras que con la sección del NOS Derecho no se

observaron diferencias significativas. La concentración de noradrenalina en los animales con sección de ambos nervios no fue detectable por los métodos utilizados. En los animales desnervados a los 32 días de edad se presentaron resultados semejantes, pero menos drásticos en el caso de sección bilateral (Tabla 4)

Tabla 4.- Media \pm e.e.m. del peso (mg), del contenido (ng) y de la concentración (ng/mg) de noradrenalina en ovario izquierdo (OI) ó derecho (OD) de ratas de 16 ó 32 días sometidas operación simulada (OS) ó a desnervación unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior y sacrificadas 72 horas después del tratamiento.

16 días					
Grupo	Ovario	n	Peso	Contenido	Concentración
OS	OI	4	6.53 \pm 0.45	2.29 \pm 0.11	0.36 \pm 0.04
	OD	4	6.46 \pm 0.87	2.09 \pm 0.35	0.32 \pm 0.03
SNOI	OI	6	9.96 \pm 0.41*	N.D. *	N.D. *
	OD	6	7.68 \pm 0.47	1.65 \pm 0.13a	0.23 \pm 0.03a
SNOD	OI	9	9.24 \pm 0.86*	1.95 \pm 0.26	0.21 \pm 0.02*
	OD	7	11.43 \pm 1.68*	0.97 \pm 0.47	0.16 \pm 0.05*
SBNO	OI	4	8.09 \pm 1.02	N.D. *	N.D. *
	OD	4	8.76 \pm 1.19	N.D. *	N.D. *
32 días					
OS	OI	8	12.26 \pm 1.29	8.69 \pm 0.97	0.73 \pm 0.07
	OD	9	12.29 \pm 1.41	7.44 \pm 0.50	0.65 \pm 0.07
SNOI	OI	6	13.10 \pm 1.72	3.30 \pm 1.53*	0.28 \pm 0.12*
	OD	6	8.32 \pm 0.65a	6.40 \pm 1.28	0.80 \pm 0.25
SNOD	OI	7	11.77 \pm 0.72	8.00 \pm 0.91	0.66 \pm 0.08
	OD	8	14.60 \pm 1.21	1.08 \pm 0.69*a	0.14 \pm 0.03*a
SBNO	OI	6	16.62 \pm 2.06	3.00 \pm 1.50*	0.29 \pm 0.12*
	OD	6	18.71 \pm 1.96*	1.43 \pm 1.19*	0.13 \pm 0.05*a

N.D. No detectable; * P< 0.05 vs OS mismo ovario
a P< 0.05 vs ovario izquierdo, mismo grupo

Efectos de la deservación al primer estro vaginal

En los animales en los que se realizó la sección unilateral o bilateral del NOS a los 16 días de edad, se presentó disminución en el contenido de noradrenalina por parte del ovario deservado. La sección del NOS Derecho a los 32 días de edad, provocó disminución significativa en el contenido de noradrenalina en ambos ovarios (Tabla 5).

Tabla 5.- Media \pm e.e.m. del peso (mg), del contenido (ng) y de la concentración (ng/mg) de noradrenalina en ovario izquierdo (OI) ó derecho (OD) de ratas de 16 ó 32 días sometidas operación simulada ó a deservación unilateral o bilateral del Nervio Ovárico Superior y sacrificadas al Primer Estro Vaginal.

16 días					
Grupo	Ovario	n	Peso	Contenido	Concentración
OS	OI	3	14.44 \pm 1.37	9.79 \pm 1.82	0.67 \pm 0.06
	OD	3	11.98 \pm 1.96	7.89 \pm 1.09	0.67 \pm 0.05
SNOI	OI	5	12.14 \pm 1.99	3.51 \pm 1.45*	0.25 \pm 0.13*
	OD	7	14.66 \pm 1.94	6.89 \pm 1.56	0.65 \pm 0.13
SNOD	OI	5	16.73 \pm 2.65	6.66 \pm 1.07	0.45 \pm 0.11
	OD	4	8.33 \pm 1.68a	3.38 \pm 0.73*a	0.52 \pm 0.20
SBNO	OI	5	18.29 \pm 2.17	N.D *	N.D *
	OD	5	16.33 \pm 1.26	1.60 \pm 1.22*	0.17 \pm 0.07*
32 días					
OS	OI	4	15.43 \pm 2.68	9.47 \pm 1.30	0.70 \pm 0.20
	OD	4	13.07 \pm 1.68	8.13 \pm 1.69	0.69 \pm 0.21
SNOI	OI	4	22.72 \pm 1.93	N.D. *	N.D. *
	OD	3	21.02 \pm 1.77*	9.53 \pm 1.48a	0.45 \pm 0.06a
SNOD	OI	5	16.12 \pm 1.04	6.41 \pm 0.24	0.40 \pm 0.03
	OD	7	13.04 \pm 1.68	0.75 \pm 0.42*a	0.14 \pm 0.05*a
SBNO	OI	5	20.96 \pm 1.55	0.50 \pm 0.40*	0.10 \pm 0.01*
	OD	5	15.75 \pm 1.35	N.D. *	N.D. *a

N.D. No detectable, * P< 0.05 vs OS mismo ovario
a P< 0.05 vs ovario izquierdo, mismo grupo

VIII. DISCUSION

La separación rápida y simultánea de las monoaminas y de sus metabolitos se realizaron durante una corrida máxima de 8 min, tiempo menor a lo reportado por otros autores trabajando con determinaciones de catecolaminas en sistema nervioso central (42). Estos resultados son en gran parte debidos a la fase móvil utilizada, ya que permitió un orden de separación de compuestos básicos, neutros y ácidos con un fino balance entre los agentes par-iónico. El buffer de citratos es además un agente fuertemente iónico que ayuda a la separación aumentando la retención del compuesto.

Las determinaciones realizadas muestran a la noradrenalina como única catecolamina presente en el ovario del animal prepúber. Estos resultados son diferentes a lo observado en animales adultos de otras cepas en las que se menciona la presencia de noradrenalina y dopamina (23). La diferencia en cuanto al tipo de catecolamina encontrada puede estar relacionada con el proceso de extracción de catecolaminas con extracción por alúmina y la eliminación del casi el 40% de estos compuestos mediante esta metodología. Es posible pensar que para verificar si existe o no la dopamina como neurotransmisor presente en el ovario deban de hacerse otras pruebas en las que la extracción sea más eficiente.

Nuestros resultados muestran que en la rata prepúber, la sección unilateral del NOS provoca una depleción ipsilateral y temporal de las concentraciones de catecolaminas ováricas a niveles incluso no detectables, dependiendo del tiempo postoperatorio en que se realicen las determinaciones del neurotransmisor. Los estudios hechos por otros autores, en el animal adulto, indican que la falta del nervio produce depleción del neurotransmisor hasta en un 70% de su contenido original (20). La diferencia entre nuestras determinaciones y las de otros autores pueden explicarse tanto en relación al modelo experimental utilizado (adulto vs. prepúber), como al tiempo de evolución postoperatorio en el que son analizados los contenidos del neurotransmisor.

En nuestra cepa de animales, los efectos agudos de la desnervación en la etapa infantil fueron más drásticos, que cuando se realiza en etapas más tardías (juvenil). Así, en el animal de 16 días de edad, la sección del NOS Izquierdo se tradujo en una señal que actúa sobre el ovario inervado (el derecho), incrementando el contenido de noradrenalina ovárica en las primeras 24 horas después de la desnervación. Es importante señalar que el fenómeno se presenta cuando se desnerva el ovario izquierdo y no cuando se elimina la información que llega al ovario a través del NOS derecho. Estos resultados estarían en concordancia con

la idea de transferencia de información entre los ovarios, reportada al analizar los efectos de diferentes manipulaciones y utilizando como modelo de estudio a la rata adulta hemicastrada, o la prepúber denervada (29, 44).

Nuestros resultados permiten sugerir que dicha señal sería de tipo neural y unidireccional, viajando desde el ovario izquierdo al derecho.

Por otra parte, el curso temporal en el contenido de catecolaminas, muestra que después de 25 días de realizada la desnervación, el ovario desnervado intenta restablecer el contenido normal de noradrenalina. Estas evidencias apoyan la idea de que el ovario del animal prepúber es capaz de sintetizar noradrenalina *de novo* (21), o bien que otras fuentes de inervación catecolaminérgica al ovario suplen esta falta .

Por otra parte el hecho de que las concentraciones de noradrenalina de los animales desnervados a los 32 días de edad y sacrificados al primer estro vaginal sean menores que las observadas a las 72 horas, puede estar relacionado con la ovulación, tal y como ha sido reportado por otros autores con estudios *in vitro* , en los que muestran que el pico preovulatorio de gonadotropinas se acompaña de una disminución del contenido de catecolaminas intraováricas (32).

IX. CONCLUSIONES.

Nuestros resultados muestran que:

La sección unilateral del NOS provoca decremento del contenido de noradrenalina ovárica, lo cuál se acompaña de un incremento temporal del contenido del neurotransmisor en el ovario inervado.

- La falta de información que viaja por el NOS hacia el ovario, provoca modificaciones del contenido de NA ovárica que dependen del ovario que se manipule, de la edad en que se elimine la inervación y del tiempo postdesnervación en que se observen los resultados.

- Apoyan la idea de transferencia de información neuroendocrina entre ambos ovarios y que está es de tipo unidireccional.

X. BIBLIOGRAFIA

- 1.- ECKSTEIN P. Endocrine activities of the ovary. En : The ovary. S. Zuckerman (Ed). Academic Press Vol II New York. (1980).
- 2.- FINK G. The endocrine control of ovulation. Sci Prog Oxf 70; 403-423. (1986).
- 3.- BAHR J, KAO L, NALVANDOV AV. The role of catecholamines and nerves in ovulation. Biology of Reproduction 10: 273-290 (1974).
- 4.- FINK G. Neuroendocrine control of gonadotrophin secretion. Brit Med Bull. 35(2) 155-160. (1979).
- 5.- AGUADO L.I, OJEDA S.R. Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. Endocrinology 114:1845-1853, (1984).
- 6.- AGUADO, L.I, OJEDA, SR. Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. Endocrinology 114:1944-1946 (1984).
- 7.- FEDER H. Estrous Cyclicity in Mammals. Neuroendocrinology of Reproduction. Plenum Press, New York pp: 279-329 (1981).
- 8.- GUYTON A.C. Tratado de Fisiología Médica. 6a ed. Interamericana. México pp. 1186-1203. (1984).
- 9.- FINK G, AIYER M, CHIAPPA S, HENDERSON S, JAMIENSON M, LEVY-PEREZ V, PICKERING A, SARKAR D, SHERWOOD N, SPEIGHT A, WATTS A. Gonadotropic-releasing hormone: release into hypophyseal porta blood and mechanism of action. Hormonally Active Brain Peptides: Structure and Function. Plenum Press. New York. (1982).
- 10.- WATTS AG, FINK G. Pulsatile luteinizing hormone release and the inhibitory effect of estradiol 17- β in gonadectomized male and female rats: effects of neonatal androgen or exposure to constant light. Endocrinology 115. 2251-2259. (1984).
- 11.- KALRA SP, KALRA PS. Neural regulation of luteinizing hormone secretion in the rat. Endocrinology Revist 4, 311-351. (1983).

- 12.- AGUADO LI, PETROVIC SL, OJEDA SR. Ovarian b/adrenergic receptors during the onset of puberty: Characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 1124/1132. 1982
- 13.- DOMINGUEZ R, CHAVEZ R, CRUZ ME. La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. *Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción*. Porrúa 139-195. (1991).
- 14.-DOMINGUEZ R, GAITAN M, MENDEZ SA, ULLOA-AGUIRRE,A. Effects of catecholaminergic blockade by haloperidol or propranolol at different stages of the oestrus cycle on ovulation and gonadotropin levels in the rat. *Journal of Endocrinology* 113:37-44. (1987).
- 15.- BURDEN HW, LAWRENCE JE. The effect of denervation on compensatory Ovarian Hypertrophy. *Neurocrinology* 23: 368-378. (1977).
- 16.- GERENDAI I, MARCHETTI B, SCAPAGNINI U. Monoaminergic peripheral regulation of compensatory ovarian hypertrophy. Academic Press N.Y. (1979).
- 17.- BURDEN WH. Adrenergic Innervation in ovaries of the rat and guinea Pig. *American Journal Anatomy* 133; 455-462, (1972).
- 18.- AHMED CE, DEES WL, OJEDA SR. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP) containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118:1682-1689. (1986).
- 19.- KUNTZ A. The autonomic nervous system. Bailliere, Tindall & Cox, London. pp. 340-350. (1945).
- 20.-LAWRENCE IE.Jr, BURDEN HW. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomic Record*. 196:51-59 (1980).
- 21.- BEN-JONATHAN N, ARBOGAST L.A, RHOADES T. A, BAHR, J.M. Norepinephrine in the rat ovary: Ontogeny and de Novo Synthesis. *Endocrinology* 115:1426-1431. (1984).
- 22.- AGUADO LI, OJEDA SR. Prepuberal rat ovary: Hormonal modulation of b-adrenergic receptors and progesterone to adrenergic stimulation. *Biology of Reproduction* 34:45-50. (1984).
- 23.- BAHR MJ, BEN-JONATHAN N. Ovarian Catecholamines during the Pre-pubertal Period and Reproductive Cycle of Several Species. *Recent Progress Hormone Research*. Vol II.

24.- OJEDA RS, URBANSKI FH, AHMED CE. The Onset of Female Puberty: Studies in the Rat. Recent. Progress in Hormone Reseach. Vol 42: 382-442.

25.- RAMALEY JA. Biological clocks and puberty onset. Federaion Proc. 39:2355-2359 (1980).

26.- RAMIREZ VD. Endocrinology of puberty. En Handbook of Physiology. Section 7. Endocrinology. Vol. III partI pp 1-29. American Physiological Society. Washington, D.C. (1983).

27.- AGUADO LI, OJEDA SR. Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. Endocrinology 114:1944-1946. (1984).

28.- FLORES A, AYALA Ma. E. DOMINGUEZ R. Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the puberal and adult rat. Med Sci Res. 18:817-818. (1990).

29.- MORALES L, CHAVEZ R, DOMINGUEZ R. Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. Med Sci Res. 21, 15-17. (1993).

30.- FERRUZ J, AHMED CE, OJEDA RS, LARA HE. Norepinephrine Release in the ovary Is regulated by autoreceptors and Neuropeptide-Y. Endocrinology 130: 1345-1351. (1992).

31.- SESLSTAM G, NORJAVAARA E, TENGEFELT T, LUNBERG S, SANDSTROM C, PERSSON, S. Partial denervation of the ovaries by transection of the suspensory ligament does not inhibit ovulation in rats treated with pregnant mare serum gonadotropin. Anat. Record 213:392-395 (1985).

32.- NIRA BEN-JONATHAN, RUTH H, BRAW N, LAUFER R. REICH, JANICE M, BAHR, TSAFRIRI A. Norepinephrine in Graafian Follicles Is Depleted by Follicle-Stimulating Hormone. Endocrinology 110: 457-461. (1982).

33.- DOMINGUEZ R, CRUZ ME, CHAVEZ R. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. In growth factors and the ovary. Ed A.N. Hirsfiel Plenum Press. New York and London. Chap.39 pp 321-325. (1989).

34.- CHAVEZ R, DOMINGUEZ R. Effects of superior ovarian nerve section on sponteneus and induced ovulation in adult rats. Sci Res 19:41-42 (1991).

35.- NANCE DM, WHITE JP, MORGEN WH. Neural regulation of the ovary: Evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control. *Brain Research Bull* 10:353-355. (1983).

36.- WEST EW, TODD WR. *Bioquímica Médica*. 4a Ed. Interamericana S.A. de C.V. México. pp.400-450. (1985).

37.- WHITE A, HANDLER P, SMITH EL, HILL RL, LEHMAN IR. *Principios de Bioquímica*. 2a ed. Mc Hill pp. 1288-1309. (1983).

38.- BLANCO A. *Química Biológica*. 7a ed. El Ateneo. México. pp. 393-526. (1988).

39.- MONTGOMERY NC, DRYER RL, CONWHITE TW, SPESETOR AA. *Biochemistry*. 4a ed. Mosby. Londres. pp. 486, 681. (1983).

40.- HARPER, H.A., MARTIN, D.W., MAYES, P.A., RODWELL, V.W. *Bioquímica de Harper*. 9a ed. El Manual Moderno. México. pp.412, 584, 717. (1980).

41.- Mc NAIN H.G. *Memorias del curso teórico práctico de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (CLAR) Universidad Queretana, México* (1991).

42.- HADFIELD HG, CRANE ME, NUGENT EA, MILIO C, NARASIMHACHARI N. Determination of 13 catecholamines, indolamines, metabolites and precursors in less than 20 minutes during a simple HPLC run. *Journal of Liquid Chromatography* 8 (14), 2689-2697. (1985).

43.- OJEDA SR, ADVIS JP, ANDREWS WW. Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation proc.* 39: 2365-2371. (1980).

44.- CHAVEZ R, CRUZ Ma.E, DOMINGUEZ R. Modifications of the ovarian response to gonadotropins induced by catecholamine depletion in vagotomized adult rat. *Revista de Investigación Clínica*. 39: 149-153. (1987).

45.- FERRUZ J, BARRIA A, GALLEGUILLOS X, LARA, H.E. Release of norepinephrine from the rat ovary: Local modulation by gonadotropins. *Biology of Reproduction* 45:592-597. (1991).

46.- YOST, RW, ETTRE, LS, CONLON, RD. *Introducción a la cromatografía líquida práctica*. Perkin-Elmer p.208-213 (1980).

XI. APENDICES

APENDICE A

MATERIALES Y EQUIPO

Material de vidrio: Matraces kitazato 500ml., Probetas graduadas de 500ml, 100ml. Pipetas graduadas 5 y 10ml., Matraz volumetrico 10ml., Matraz Erler Meyer y filtro Millipore (Equipo de filtración), Vasos de precipitados 500ml, 100ml, 50ml.

Material de Plástico: Tubos Eppendorf 1.5ml. Matraz volumétrico.250ml., Micropipetas (100 μ l, 200 μ l, 5000 μ l) Puntas para micropipeta (1 μ l, 5ml) Gradilla para tubos eppendorf.

EQUIPO

Microcentrifuga refrigerada modelo IEC Centra MP4R.

Centrifuga Eppendorf modelo 5415C.

Vortex multicompartimental modelo Genie 2.

Detector electroquímico, Perkin Elmer, modelo CC4.

Bomba Isocrática, Perkin Elmer, modelo 250.

Integrador Perkin Elmer, modelo LC1-100.

Columna cromatográfica: Columna de fase reversa C18 marca Perkin Elmer de tamaño promedio de partícula de 10 micras de 35cm de longitud y 8mm. de diametro interno.

REACTIVOS

Metanol grado HPLC, Acetonitrilo grado HPLC, Tetrahidrofurano grado HPLC, Agua destilada y desionizada. Reactivos grado analítico: Acido citrico, Acido Perclórico, Acido octil sulfonico, Oxido de Aluminio.

APENDICE B

Soluciones:

Solución amortiguadora TRIS 0.5M pH=8.6

Fase móvil: Solución amortiguadora de citratos (500ml)

Soluciones estandares de 5ng de NA, DHBA, DA.

Preparación de la muestras:

Pesar los organos en los tubos eppendorf, sonicar a 50ciclos por minuto, centrifugar a 12.000 rpm, colectar sobrenadante, adicionar alumina y poner a rotar por 10min. lavar con agua bidestilada por duplicado desechar alumina y resuspender en acido perclorico 0.1M. Inyectar.

Para prevenir el deterioro de los estandares asi como de las muestras, se tomaron las siguientes precauciones:

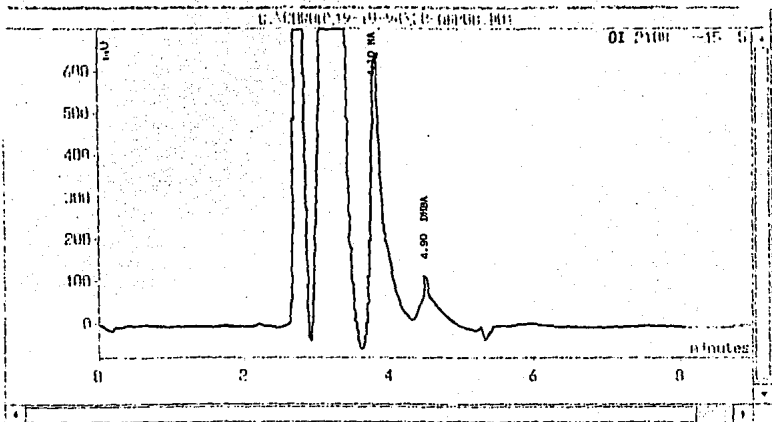
Tanto los estandares como las muestras se mantuvieron a -70 grados.

El tratamiento de extracción de las muestras se realiza en frío todo el tiempo, estas medidas reducen la labilidad de los componentes a determinar particularmente de la NA.

El empleo del DHBA como el estandar interno de elección fue debido a la similitud estructuras químicas, asi como el presentar un tiempo de retención cercano al neurotransmisor determinado (NA), y es además el sugerido por otros autores en la bibliografía .

En cuanto a la calibración de los estandares en un analisis eficiente de las catecolaminas, incluyeron varias repeticiones para cada una de ellas por cada día de trabajo.

La sensibilidad para la noradrenalina estuvo en un rango de nanogramos por miligramo ng/mg.



Cromatograma de una muestra de ovario corrida bajo las condiciones citadas en el Apéndice A

APENDICE C

VALIDACION DE UN METODO CROMATOGRAFICO

La validación es un juicio que proporciona el fundamento para decidir si un método reúne las condiciones necesarias para su aplicación en análisis químico. De este modo se puede decir que la validación es la comprobación y verificación de la efectividad y reproducibilidad de una técnica, una operación o un proceso, también es el proceso para determinar que tan adecuada es una metodología para proporcionar resultados analíticos dentro de un margen establecido.

Para poder establecer que la validación de un método este tiene que cumplir los siguientes parámetros analíticos como son Precisión, Exactitud, Repetibilidad, Linearidad entre otros.

- Precisión. Se refiere a la semejanza de una serie de análisis sobre la misma muestra y esta representada en términos de desviación estandar.

- Exactitud. Es una determinación de que tan cercano un resultado, o la media de una serie de valores concuerda con el valor real.

- Repetibilidad. Es la dispersión de los resultados cuando se ha reducido al mínimo el valor determinado.

- Linearidad. Es una medida del rango al cual la curva de calibración analítica se aproxima a una línea recta, o el grado al cual la sensibilidad es constante.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA