



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA  
DE MEXICO**

16  
lej

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
ZARAGOZA**

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACION DE LA INERVACION  
NORADRENERGICA PERIFERICA SOBRE LA  
RESPUESTA OVULATORIA INDUCIDA POR LA  
ADMINISTRACION DE GONADOTROPINAS O  
ESTROGENOS DURANTE LA FASE INFANTIL  
DE LA RATA.**

**T E S I S**

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

**B I O L O G O**

P R E S E N T A :

**RUBEN LOYO PEREZ**

**U N A M  
F E S  
Z A R A G O Z A**



**LA UNAM  
DE NUESTRA DIVISION**

**DIRECTORA DE TESIS: M. en IBGH. ANGELICA FLORES RAMIREZ**

**MEXICO, D. F.**

**ENERO 1996**

**TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**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 esta 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 AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
'ZARAGOZA'**

**ESTUDIO DE LA PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN  
NORADRENÉGICA PERIFÉRICA SOBRE LA RESPUESTA  
OVULATORIA INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE  
GONADOTROPINAS O ESTRÓGENOS DURANTE LA FASE  
INFANTIL DE LA RATA.**

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: **Rubén Loyo Pérez..**

Directora de tesis: M. en IBSH. **Angélica Flores Ramírez.**

Realizada en : Laboratorio . Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.  
FES-Zaragoza, U.N.A.M.

**Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de DGAPA Clave IN  
210893, CONACYT IN 1719 y el Programa Universitario de Investigación en  
Salud (PUIS), UNAM.**

## **AGRADECIMIENTOS**

A la M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez por su asesoría, paciencia, amistad y sobre todo por haber creído en mí.

Al Dr. Roberto Domínguez Casala por su valiosa ayuda y sugerencias para la realización de este trabajo.

A los miembros del jurado:

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez.  
M.C. Raúl Zavala Chavero.  
M. en IBSH. Leticia Morales Ledesma.  
Biol. Carlos Martínez Montoya.  
M. en BRA. Judith Villavicencio Macías.

Por su valiosa ayuda al revisar esta tesis y sus valiosas sugerencias.

A Ma. Luisa Ilescas Vera por su valiosa colaboración.

A Adriana Espinoza Ortega por introducirme al estudio de la Biología.

A Esther por sus valiosas sugerencias

A Lorena Hinojosa por su sincera amistad la cual espero perdure por mucho tiempo.

A Nicolas y Maru por que realmente sabemos el trabajo que compartimos.

A Adriana, Carlos y Lilia por la amistad tan linda que ha surgido en tampoco tiempo.

A mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, por su amistad y sus sugerencias.

Alejandro, Ana, Angélica, Carolina, Evangelina, José Luis, Juana, Judith, Leticia, Lorena H., Lorena G., Ma. Elena, Ma. Esther, Ma. Luisa, Nicolas, Paola, Patricia, Rebeca, Roberto, Romeo, Ubaldo.

A mis amigos de la Carrera.

Alvaro, Clemencia, Daniel, Francisco, Jorge, Manual, Martha, Norma, Patricia, Raúl, Rocío. Por los "años maravillosos" que compartimos y por que todos tenemos la misma meta.

**A (Ustedes) mis Padres: *Erasmus y Florencia Dudelín***

**Por haberme dado la vida y por que con su mano firme guiaron mis pasos para estar hoy en este lugar tan importante para mí.**

**A mis Hermanos : *Antonio, Irma y mi cuñada Flor***

**Toda mi gratitud y comprensión por haber compartido conmigo desvelos, carencias pero siempre guiadas hacia una meta, y lo más importante jamás me dejaron caer. Mil gracias por su dedicación y cariño pero principalmente por su apoyo sin el cual, no hubiera logrado estar hoy aquí.**

**A mí Sobrina : *Yesica Jazmín***

**Por que llegaste a formar parte muy importante en nuestra familia y por tus temas ocurrencias**

**A *Claudia***

**Por que nunca terminare de agradecerle a la vida el haberte conocido.**

## ANTES DE AMANECEER

Antes de que amanezca  
el alma mía está dispuesta a luchar  
dejaré en la obscuridad mi cobardía  
porque ya el nuevo día va ha comenzar

Me voy a superar, ese es mi empeño,  
mil veces me lo voy a repetir,  
hoy serán realidad todos mis sueños  
mis enormes deseos de vivir.

Me asomaré al balcón  
y en el viento escribiré mi nombre sin  
cesar, y me diré con fe:  
"estoy contento en este día tengo que  
triunfar"

Y al sentir lo infinito de mi esencia  
absorto pensaré: gracias señor,  
por haberme regalado la existencia  
y por la ventura de tu amor.

Que bello es el mundo que nos diste,  
que sublime tu gran misericordia,  
te prometo que hoy no estaré triste  
ni buscaré motivos de discordia.

Y al contemplar el paisaje luminoso  
ante el mudo esplendor de la creación  
todo mi ser se llenará de gozo  
e inundaré de paz mi corazón.

Hoy voy ha perdonar al que me ofenda,  
como lo dice la oración  
y voy ha ayudar al que pretenda  
pedirme en su amargura algún favor.

Hoy voy ha tratar de ser distinto  
con un nuevo vigor, con un nuevo anhelo  
haré triunfar la piedad sobre el instinto  
para subir un peldaño hacia el cielo.

Antes de amanecer estoy dispuesto  
a enfrentarme a la vida con valor,  
acaptaré gustoso el dulce reto  
de que cada día voy a ser mejor.

## INDICE

RESUMEN .....	1
INTRODUCCIÓN .....	1
PUBERTAD .....	1
FASES DEL DESARROLLO POSTNATAL .....	2
1.- FASE NEONATAL .....	2
2.- FASE INFANTIL .....	3
3.- FASE PREPÚBER O JUVENIL .....	6
4.- FASE PERIPUBERAL .....	8
INERVACIÓN DEL OVARIO.....	11
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA .....	18
HIPÓTESIS .....	18
OBJETIVO GENERAL .....	19
OBJETIVOS PARTICULARES .....	19
MATERIALES Y MÉTODO .....	20
RESULTADOS .....	22
DISCUSIÓN .....	42
CONCLUSIONES .....	47
BIBLIOGRAFÍA .....	48

## RESUMEN

Se tienen evidencias de que durante la fase infantil de la rata hembra, la respuesta ovulatoria inducida por vía hormonal, con estrógenos o gonadotropinas, no es estimulada debido a los efectos inhibitorios de los mecanismos neuroendócrinos presentes. Por otro lado, se ha demostrado que en el animal prepúber, el papel de la inervación noradrenérgica del ovario regula de manera inhibitoria la acción de las gonadotropinas que culminan con la ovulación espontánea. Con el fin de estudiar si dicha inervación participa en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la pubertad (apertura vaginal) y la ovulación inducida durante la fase infantil, en el presente trabajo se analizó la capacidad de respuesta de los ovarios con desnervación noradrenérgica periférica, producida desde el nacimiento por la inyección de guanetidina (20 mg/kg P.C.), a la administración de gonadotropinas o estrógenos a los 15, 18 ó 21 días de edad.

El tratamiento con estrógenos (10 µg BE) adelantó la edad de la apertura vaginal en los animales tratados a los: 15 días:  $20.3 \pm 0.3$  días; 18 días:  $21.3 \pm 0.3$  días y 21 días de edad:  $24.4 \pm 0.3$  días, respecto a los animales sin ningún tratamiento:  $41.4 \pm 1.1$ , ( $P < 0.001$ ), pero en ninguno de ellos se indujo la ovulación. Estos efectos no fueron modificados cuando a los animales se les provocó la denervación noradrenérgica del ovario y que luego fueron inyectados con la hormona.

El peso del útero aumentó significativamente con respecto al de los animales testigo (T) sacrificados a la misma edad. [BE-15:  $122.2 \pm 8.2$  vs  $72.0 \pm 6.74$  mg/100g; BE-18:  $218.7 \pm 23.8$  vs  $67.5 \pm 3.8$  mg/100g; BE-21:  $151.2 \pm 16.4$  vs  $90.5 \pm 6.2$  mg/100g ( $P < 0.001$ )]. La masa ovárica disminuyó en los animales tratados a los 21 días [BE:  $36.4 \pm 3.6$  vs  $52.3 \pm 3.4$  mg/100g ( $P < 0.001$ )].

En los animales desnervados, tratados con estrógenos a los 15 días de edad, el peso de los ovarios disminuyó [ $24.1 \pm 2.9$  vs  $37.4 \pm 3.4$  mg/100g], mientras que aumentó en las ratas tratadas a los 21 días [ $51.2 \pm 2.4$  vs  $36.4 \pm 3.5$  mg/100g ( $P < 0.001$ )]. El peso del útero en los animales tratados a los 18 días de edad disminuyó [GTD+BE:  $133.7 \pm 12.6$  vs  $218.6 \pm 23.8$  mg/100g ( $P < 0.001$ ) y aumentó a los 21 días de edad [GTD+BE:  $201.6 \pm 12.5$  vs  $151.2 \pm 16.4$  mg/100g ( $P < 0.05$ )].

La administración de PMSG (8 u.i.) también estimuló el adelanto en la edad de la apertura vaginal en los animales inyectados a los 15 días:  $20.8 \pm 0.3$  días; 18 días:  $22.0 \pm 0.0$  días y 21 días de edad:  $24.5 \pm 0.3$  días respecto a los animales sin tratamiento:  $41.4 \pm 1.1$ , ( $P < 0.001$ ). En los ovarios de dos de los ocho animales tratados a los 18 ó 21 días se observaron cuerpos lúteos recién formados. La desnervación noradrenérgica periférica en los animales inyectados con la gonadotropina no modificó la edad de la pubertad, pero indujo que en los animales tratados con la hormona a los 18 ó 21 días, el 56% de ellos presentara signos de ovulación.

El peso del útero aumentó en todos los animales tratados con la gonadotropina respecto al de los animales testigo (T) sacrificados a la misma edad. [PMSG-15:  $141.3 \pm 19.4$  vs  $71.4 \pm 7.3$  mg/100g; PMSG-18:  $307.7 \pm 25.6$  vs  $72.3 \pm 3.0$  mg/100g; PMSG-

21:  $219.8 \pm 21.9$  vs  $88.6 \pm 6.3$  mg/100g ( $P < 0.001$ )), esta respuesta no se alteró cuando los animales previamente fueron desnervados.

Solamente en los animales inyectados con la gonadotropina a los 18 días, aumentó el peso de los ovarios [PMSG:  $91.4 \pm 13.7$  mg/100g vs  $47.5 \pm 1.9$  mg/100g ( $P < 0.001$ )]. El mismo efecto se presentó cuando los animales fueron desnervados desde el nacimiento y tratados con PMSG a los 21 días [GTD + PMSG:  $113.9 \pm 7.6$  vs  $70.0 \pm 18.9$  mg /100 g]).

El tratamiento secuencial con PMSG (8 u.i.) y 56 horas más tarde con hCG (10 u.i.) también indujo la misma respuesta en la edad de la apertura vaginal en los tratados a los 15 días:  $20.9 \pm 0.3$ ; 18 días:  $22.0 \pm 0.0$  y 21 días de edad:  $24.8 \pm 0.3$ , la cual no fue modificada por la desnervación noradrenérgica ovárica. La administración de las gonadotropinas estimuló la ovulación en tres de los ocho animales tratados, sin embargo, la desnervación noradrenérgica periférica estimuló que el 75 % de los animales ovularan. De igual forma, a los 21 días las gonadotropinas estimulan que el 50% de los animales ovulen, lo que se incrementó al 100% cuando son previamente desnervados.

El peso del útero se incrementó en todos los animales tratados con ambas gonadotropinas [15 días:  $197.7 \pm 17.0$  vs  $77.7 \pm 7.1$  mg/100g; 18 días:  $125.3 \pm 4.5$  vs  $72.3 \pm 3.0$ ; y 21 días:  $156.3 \pm 83.0$  vs  $83.0 \pm 5.8$  mg/100g ( $P < 0.001$ )], lo que no se modificó cuando los animales fueron desnervados desde el nacimiento.

La administración de ambas gonadotropinas a los 18 y 21 días provocó incremento en el peso de los ovarios [18 días:  $71.9 \pm 5.6$  vs  $47.5 \pm 1.9$  mg/100g ( $P < 0.001$ ); 21 días:  $186.4 \pm 42.2$  vs  $50.8 \pm 2.8$  mg/100g ( $P < 0.001$ )], mientras que el peso de los ovarios de los animales desnervados tratados a los 15 días de edad fue menor que en sus testigos [  $42.2 \pm 2.9$  vs  $60.7 \pm 8.6$  mg/100g y mayor en los inyectados a los 18 días [ $123.6 \pm 10.0$  vs  $71.9 \pm 5.6$  mg/100g]).

Los resultados del presente estudio muestran que durante la fase infantil la capacidad esteroidogénica de los ovarios es directamente proporcional a la edad de los animales. A los 15 días de edad, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario aún no alcanza la madurez, central y periférica, en los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación. Sin embargo, a los 18 días de edad se empieza a manifestar que la inervación noradrenérgica periférica modula inhibitoriamente la acción de las gonadotropinas sobre el proceso de la ovulación, lo cual es claramente evidente a los 21 días de edad.

## INTRODUCCIÓN

### PUBERTAD

Se define a la pubertad como la fase biológica del individuo en la que ocurren una serie de eventos neuroendócrinos, que ocurren a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, y fenotípicos que enlazan la Inmadurez con la madurez sexual (Blandau y Money, 1943; Ojeda y Urbanski, 1994). A partir de ese momento el animal alcanza la capacidad de reproducirse (Ramírez, 1973).

En la regulación de los eventos que culminan con la pubertad participan la información genética, la nutrición, los estímulos sociales y algunas condiciones ambientales (como el fotoperiodo y la temperatura ) (Ramírez, 1973). Además, las feromonas también juegan un papel muy importante para regular el inicio de la pubertad. Por ejemplo en el ratón hembra *Mus musculus* de 24 días de edad, la aplicación del extracto urinario del ratón macho en sus fosas nasales provocó adelanto de la pubertad, evaluado por un incremento en el peso del útero. Por los resultados obtenidos se le ha denominado extracto urinario acelerador de la pubertad (PAUE) (Diuzen y col., 1992).

Se ha observado que cuando el ratón hembra juvenil está en presencia de un ratón macho adulto durante 8 días, se adelanta la edad del primer estro vaginal y se incrementa el contenido de Noradrenalina (NA) y dopamina (DA) en el hipotálamo medio basal. Por tal motivo se puede mencionar que las condiciones sociales específicas en que se desarrolla el animal tienen efecto sobre el sistema catecolaminérgico y en el inicio de la pubertad (Darney y col., 1992).

Ramsley (1979) menciona que en la rata hembra la pubertad comienza entre los 15 y 20 días de edad, con el inicio del desarrollo de los folículos ováricos, y se caracteriza por la canalización vaginal, precedida por la hinchazón y el cambio de color de la membrana vaginal antes de su ruptura. Al primero ó segundo día posterior de haberse producido la apertura vaginal, se presenta la ovulación. En algunas cepas de ratas la citología vaginal muestra células

cornificadas (estro vaginal) en ese mismo día (Goldman, 1981; Ramaley y Phares, 1980; Ramírez, 1973).

En la rata, la canalización vaginal es estimulada por los estrógenos que son sintetizados y liberados por los ovarios en respuesta a la acción de las gonadotropinas, lo cual ocurre principalmente el día posterior a la primera liberación preovulatoria de las gonadotropinas. Estas son glucoproteínas que son secretadas por la adenohipófisis y se conocen con el nombre de hormona estimulante del folículo (FSH) que participa en la regulación del crecimiento y diferenciación de los folículos; y la hormona luteinizante (LH) que junto con la FSH promueve la ovulación, el desarrollo del cuerpo lúteo y estimula las últimas etapas del desarrollo folicular (Bousfield y col. 1994). La síntesis y liberación de ambas gonadotropinas están reguladas por la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). La GnRH es un decapeptido que es sintetizada por neuronas del hipotálamo, liberada dentro de los vasos porta hipofisarios y transportada a la adenohipófisis donde estimula la liberación de las gonadotropinas (Fink, 1986).

#### **FASES DEL DESARROLLO POSTNATAL**

En la rata hembra, el desarrollo de los mecanismos que participan en la regulación de la pubertad se produce en un lapso de cinco semanas; en ese tiempo el peso corporal aumenta 15 veces y la longitud del cuerpo tres veces (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Para su estudio, las etapas por las que pasa el animal desde el nacimiento hasta la pubertad se han dividido en 4 fases con base en parámetros morfológicos y fisiológicos (Ojeda y col., 1986., Ojeda y Urbanski, 1994):

##### **1.- FASE NEONATAL:**

Se inicia al nacimiento y termina a los 7 días de vida. En esta fase el ovario es relativamente insensible a las gonadotropinas, por lo menos hasta los 4 ó 5 días y la capacidad para secretar estrógenos es aún mínima. Al parecer, la falta de respuesta del ovario a las gonadotropinas se debe al bajo contenido de

receptores gonadotrópicos o a la deficiencia de enzimas esteroidogénicas (Funkenstein y col., 1980).

En el animal recién nacido, la ovariectomía no provoca el aumento de las concentraciones plasmáticas e hipofisarias de las gonadotropinas, por lo que los efectos inhibitorios que en el animal adulto ejercen los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas, no son efectivos en esta fase. Esta falta de respuesta no se debe a la ausencia de receptores a estrógenos en el hipotálamo y la hipófisis, sino a la alta concentración de la  $\alpha$ -fetoproteína en el suero y los tejidos. La  $\alpha$ -fetoproteína es una molécula que tiene la capacidad de enlazar a los estrógenos con gran afinidad lo que impide que haya estrógenos disponibles para unirse a sus receptores. Este hecho permite postular que la  $\alpha$ -fetoproteína protege al cerebro de cantidades excesivas de estrógenos (Ojeda y col., 1986).

En el folículo ovárico de la rata después de los cuatro días de edad, la FSH estimula la conversión de testosterona a estrógenos (Funkenstein y col., 1980). Esto se debe a que la FSH induce la síntesis o la expresión de sus propios receptores a partir de los cuatro días de edad. Los estrógenos estimulan el inicio de la foliculogénesis ya que la administración de antisuero a estrógenos durante esta fase provoca la disminución significativa del diámetro de los folículos y el peso de los ovarios (Ramaley, 1979).

Por otro lado, las gonadotropinas son esenciales para mantener el desarrollo folicular ya que al final de la fase neonatal, se hace evidente la respuesta esteroidogénica del ovario a las gonadotropinas (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

## **2.- FASE INFANTIL:**

Esta fase se extiende del día 8 al 21 de vida y durante ella ocurren una serie de cambios en el eje sistema nervioso central (SNC)-hipófisis que representan los primeros eventos neuroendócrinos que tienen un gran impacto sobre el momento en que se inicia la pubertad (Ojeda y col., 1986).

Las concentraciones plasmáticas de la FSH se incrementan hasta alcanzar valores máximos alrededor del día 12 y luego disminuyen hasta llegar a valores muy bajos poco antes del primer proestro (Ojeda y col., 1986), mientras que el incremento en la concentración sérica de la LH es en forma de pulsos esporádicos (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Döhler y Wuttke, 1975).

Este primer periodo de activación de la secreción de las gonadotropinas tiene un origen central. Aunque depende de la influencia de esteroides, se puede reflejar una desorganización de la actividad de las neuronas que liberan o sintetizan a la GnRH.

Durante la segunda semana de vida posnatal, el ovario ya se desarrolla bajo el control gonadotrópico; una gran cantidad de folículos primordiales comienzan a crecer y diferenciarse por efecto de la FSH y algunos de ellos serán destinados a ovular en la pubertad (Ojeda y Urbanski, 1994).

Esto puede ser interpretado como el reflejo de los eventos de maduración que ocurren en el SNC y la adenohipófisis y se asume que los estrógenos juegan un papel definitivo en el desarrollo de tales eventos (Ojeda y col., 1986).

En la rata hembra adulta, la concentración plasmática de la FSH es regulada por los efectos de los esteroides sexuales y la foliculoestatina o inhibina, proteína que inhibe la secreción de la FSH y que se encuentra en el líquido folicular de los folículos ováricos. Se puede argumentar que la disminución de la secreción de la FSH después del día 12 de edad, es el resultado del efecto combinado del aumento en la concentración de estradiol libre y de la producción de la foliculoestatina por los folículos en crecimiento y maduración (Ramaley, 1979).

Así, en el día 16 de edad las concentraciones séricas de la  $\alpha$ -fetoproteína se encuentran disminuidas y por lo tanto aumenta la concentración de estrógenos libres en la circulación y en el SNC (Andrews y col., 1981). Este cambio posibilita que los estrógenos ejerzan su acción inhibitoria a nivel central, lo que puede

explicar la disminución de la concentración de la FSH plasmática después del día 12 de vida posnatal (Andrews y Ojeda, 1977).

Existen evidencias de que los ovarios presentan dos modelos de esteroidogénesis. En las fases neonatal, infantil y después de la pubertad, los principales esteroides C-19 (andrógenos) formados por el ovario a partir de la progesterona, son la androstenediona y la testosterona. Dado que en la rata inmadura existen altas concentraciones plasmáticas de estos compuestos, se sugiere que durante esta fase participan en la regulación de la secreción de las gonadotropinas (Andrews y Ojeda, 1981; Döhler y Wuttke, 1975; Ojeda y col., 1986; Ramaiey, 1979).

Debido a que durante la fase infantil los ovarios de la rata producen androstenediona y testosterona, se sugiere que el inicio de la retroalimentación inhibitoria ejercida por los esteroides sobre la secreción de las gonadotropinas, se realiza por intermedio de los andrógenos aromatizables. No se conoce si el efecto de la testosterona es debido a su capacidad androgénica o porque es aromatizada a estrógenos en el hipotálamo (Andrews y Ojeda, 1981). Sin embargo, se ha observado que entre los 16 y 20 días de vida posnatal es necesario que aumente la secreción de esteroides para aumentar la secreción de la LH (Ojeda y col., 1983).

Existen evidencias que permiten suponer que los centros neuroendócrinos que regulan la liberación de la LH estarían funcionando ya en los animales de 18 días de edad, aunque su puesta en marcha se produce hacia el final de la fase infantil. Esto se apoya en resultados obtenidos por diversos autores que han tratado de inducir la ovulación en los animales a partir de los 17 días de edad, administrando gonadotropinas o estrógenos, y debido a la ausencia de ovulación, se ha sugerido que este proceso es inhibido porque el animal aún es inmaduro hormonalmente a nivel central, periférico o ambos, o porque existen otros mecanismos, ¿de naturaleza neural? que lo inhiben (McCormack y Meyer, 1964; Richards y Bogovich, 1982; Sawamoto y Sasamoto, 1973; Taya y col., 1974; Zarrow y col., 1971; Zarrow y Quinn, 1963; Zarrow y Wilson, 1961).

### **3.- FASE PREPÚBER O JUVENIL:**

Al comienzo de la fase prepúber, en el día 22 de vida, la concentración plasmática de la  $\alpha$ -fetoproteína continúa decreciendo, por lo que existe un aumento de las concentraciones plasmáticas de estrógenos lo que resulta en el aumento de la secreción de la LH (Andrews y Ojeda, 1981; Ojeda y col., 1986). La concentración de la FSH disminuye sensiblemente y la de LH que mostraba liberación esporádica se transforma en una secreción de tipo pulsátil, alcanzando concentraciones de un 10% de lo observado en el día del proestro (Andrews y Ojeda, 1981; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Los cambios más importantes se producen en relación con la LH, que comienza a secretarse en forma pulsátil y que, hacia el final de la fase, incrementa sus valores basales y la amplitud de sus pulsos durante la tarde, estableciéndose un ritmo de secreción circadiano. A nivel ovárico se observa un aumento de receptores a LH que junto con el patrón de secreción de la LH se traduce en una mayor esteroidogénesis (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

El establecimiento de este ritmo diurno en la liberación de LH puede ser el reflejo de la coordinación del oscilador circádico del hipotálamo, que se encuentra en el núcleo supraquiasmático, con un sistema neuronal excitatorio que estimula la liberación de la GnRH y la sincronización de las descargas del decapeptido. Este proceso puede ser facilitado por los efectos de los estrógenos pero no es determinado por la disminución en la sensibilidad del hipotálamo al feedback negativo (Ojeda y Urbanski, 1994).

Por otra parte, aún cuando en esta fase en el ovario se presentan ondas de crecimiento folicular y atresia, los folículos no tienen la capacidad de alcanzar el estado ovulatorio, ya que la adquisición de esta capacidad está modulada por múltiples factores hormonales y neurogénicos que regula el SNC. (Ojeda y col., 1983).

Además de la FSH y la LH la adenohipófisis secreta otras dos hormonas, la prolactina (PRL) y la hormona de crecimiento (GH) o somatotropina, las cuales juegan un papel determinante en la pubertad de la rata hembra (Döhler y Wuttke, 1975; Ojeda y Jameson, 1977).

Al inicio de la fase juvenil la PRL se libera cada tres horas, con una secreción mayor a media tarde y durante las horas tempranas de la mañana. Conforme el animal alcanza el final de esta fase desaparece el incremento nocturno en la concentración plasmática de la PRL al tiempo que es más prominente en la tarde (hacia la tercera semana de vida posnatal). Se ha sugerido que los cambios vespertinos en la secreción de la hormona se inician en el SNC por un mecanismo que es independiente de las gónadas, pero cuya señal es amplificada por los estrógenos (Ojeda y col., 1986).

La administración de la PRL provoca el adelanto del inicio de la pubertad por sus efectos sobre el SNC y el ovario. En este último, la hormona favorece el desarrollo folicular y aumenta la secreción de estrógenos en respuesta a las gonadotropinas ya que facilita la acción de la LH porque mantiene o incrementa la formación de receptores a ésta o por ambos factores (Ojeda y col., 1983; 1986).

Los cambios significativos en la concentración de la GH que preceden por varios días a la liberación de las gonadotropinas, que acompañan normalmente el inicio de la pubertad, sugieren que esta hormona puede jugar un papel fisiológico en el control de dicho proceso. La inhibición de su liberación retrasa el inicio de la pubertad, lo cual no está relacionado con cambios en el peso corporal, pero provoca retraso en el desarrollo ovárico (Ojeda y Jamenson, 1977).

Al igual que la PRL, la GH puede actuar sobre el ovario donde aumenta la secreción de esteroides en respuesta a la estimulación gonadotrópica (Advis y col., 1981). En cultivo de células de la granulosa de ovarios de ratas inmaduras hipofisectomizadas se ha demostrado que la adición de la GH facilita los efectos de la FSH para inducir la síntesis o la expresión de receptores a la LH y para estimular la secreción de progesterona. También facilita el efecto estimulador del AMPc sobre la secreción de progesterona, lo que indica que actúa principalmente

estimulando la función de las células de la granulosa. Así, durante la fase juvenil el ovario madura principalmente bajo la influencia estimuladora de la FSH y la LH, y de manera complementaria por los efectos estimulantes de la PRL y la GH (Ojeda y col., 1983; 1986).

Esta fase termina alrededor de los 30 ó 32 días de vida cuando se presentan las primeras manifestaciones del aumento de la actividad estrogénica expresada por la presencia de líquido en la luz del útero (Ojeda y col., 1983).

#### **4.- FASE PERIPUBERAL:**

Esta fase presenta una duración variable y se sitúa alrededor de la edad de la apertura vaginal e incluye los días que preceden a la primera ovulación. Así, en esta fase se lleva a cabo una cascada de eventos que culminan con el primer pico preovulatorio de gonadotropinas y la primera ovulación.

Conforme se llega a la pubertad los ovarios adquieren gradualmente la capacidad de secretar estrógenos como una consecuencia de la estimulación gonadotrópica (Ojeda y col., 1986). Durante este cambio ocurren dos eventos muy importantes: a) Existe un incremento en los receptores a la LH, que aunque ya se manifestó durante la fase infantil, es más evidente en la cuarta semana de vida; b) Existe una disminución en el número de receptores a la GnRH, siendo más evidente durante los días en que se presenta la primera ovulación (Dalkin y col., 1981).

Dado que la GnRH inhibe la función gonadal se puede sugerir que la disminución en el contenido de receptores a la GnRH refleja una disminución de la influencia inhibitoria del péptido sobre el desarrollo folicular. Así, el incremento simultáneo de los receptores a la LH provee la amplificación necesaria para su acción estimuladora (Ojeda y col., 1986).

Aunque el inicio de la pubertad está determinado por múltiples factores interrelacionados, algunos de los cuales tienen su origen durante la fase infantil, las manifestaciones neuroendócrinas del proceso se vuelven evidentes después

de la cuarta semana de vida. Durante esta fase las concentraciones plasmáticas de la PRL y de la GH se incrementan, lo mismo ocurre con la secreción de estrógenos por el ovario en respuesta al estímulo gonadotrópico (Advis y col., 1981; Ojeda y Jameson, 1977; Ojeda y col., 1986; Ojeda y Urbanski, 1994).

Los estrógenos secretados por el ovario activan el componente central estimulador de la secreción de las gonadotropinas, lo que resulta en el aumento de las concentraciones plasmáticas de las mismas. Este incremento se acompaña del crecimiento y la maduración folicular que culmina con la primera ovulación (Ojeda y col., 1986).

En los animales peripuberales se ha registrado un cambio adicional en la secreción de la LH que consiste en la secreción episódica que se da por una o dos horas, denominada "miniaumento" y que es dependiente de los estrógenos. Estos miniaumentos estimulan la producción de estradiol por el ovario, lo que indica que la secuencia de eventos hormonales que permite la primera liberación preovulatoria de las gonadotropinas es iniciada por los cambios vespertinos de la liberación pulsátil de la LH [(Fig. 1). Urbanski y Ojeda, 1985; Ojeda y Urbanski, 1994].

El incremento de las concentraciones plasmáticas de la LH estimula la producción de estradiol por el ovario, lo que a su vez provoca los miniaumentos en la secreción de la LH. La estimulación del ovario por el efecto combinado de los pulsos vespertinos de la LH incrementados y los miniaumentos, llevan a que las concentraciones de estradiol alcancen una magnitud y duración suficiente como para estimular la primera liberación de gonadotropinas. Este incremento se acompaña del crecimiento y la maduración folicular que culmina con la primera ovulación (Ojeda y col., 1986; 1989).

Las concentraciones preovulatorias de estradiol pueden estimular la liberación de la LH, en el inicio de la fase juvenil (día 21), lo cual puede indicar que la pubertad depende de que el ovario adquiera la capacidad de producir concentraciones de estradiol de magnitud preovulatoria. En contraste, el cambio en la liberación de la LH pulsátil, que señala el inicio de la pubertad, es originado

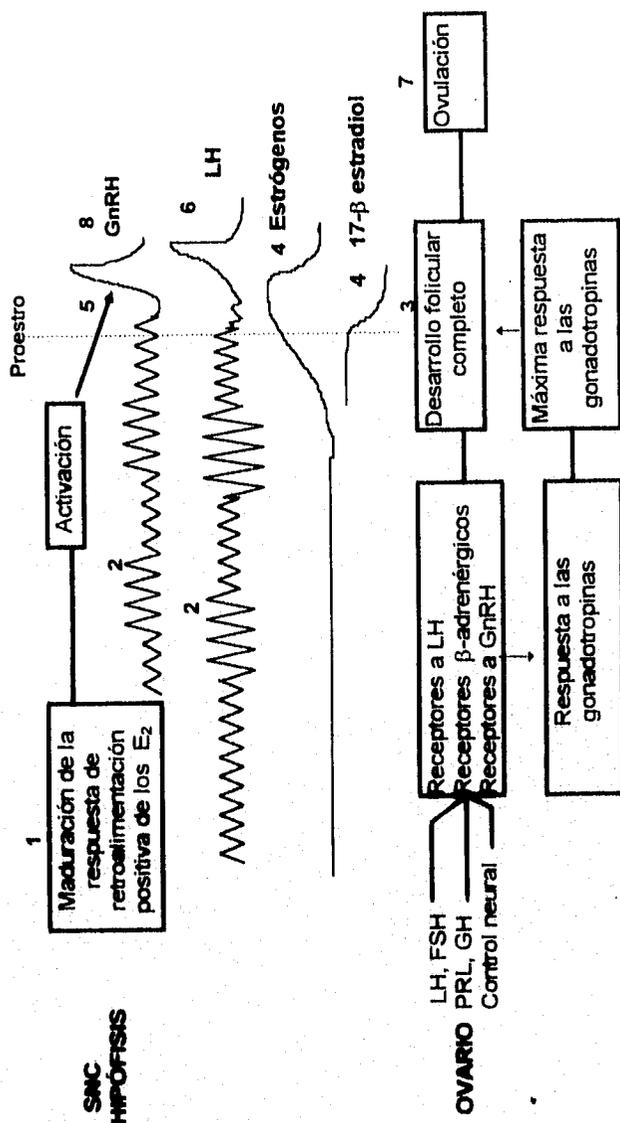


Fig 1. Eventos que preceden a la primera secreción preovulatoria de gonadotropinas en la rata hembra. Los números indican la secuencia en que se producen estos eventos. La línea discontinua representa las 12:00 h del primer proestro. GnRH, hormona liberadora de gonadotropinas; LH, hormona luteinizante; FSH, hormona estimulante del folículo; PRL, prolactina; GH, somatotropina (Ojeda y Urbanski, 1984).

centralmente y es un evento independiente de las gónadas. Esta conclusión se deriva del análisis del perfil pulsátil de la LH en animales ovariectomizados durante las fases de desarrollo juvenil o peripuberal (Ojeda y col., 1989).

El incremento en la secreción de la GnRH induce el aumento en la secreción de las gonadotropinas, las que a su vez estimulan la respuesta ovárica, que se refleja por el aumento de la concentración plasmática de estrógenos. Por otra parte, la secreción de progesterona que aumenta al final de la fase prepúber, sigue incrementándose también en la fase peripuberal y estimula la liberación de la GnRH. En su conjunto estos eventos inducen la aceleración del crecimiento y la maduración folicular que culminan con la ovulación (Advis y col., 1979; Fink, 1986).

En esta fase la maduración de los ovarios está regulada por las gonadotropinas, aunque en la etapa neonatal e infantil esta regulación puede estar modulada por la GnRH materna, la GH y la PRL (Ojeda y Urbanski., 1994).

Raum y col. (1980) han postulado la teoría del gonadostato hipotalámico, en la cual plantean que se presenta una disminución en la sensibilidad del SNC y la hipófisis a los efectos inhibitorios que ejercen los esteroides gonadales en la síntesis de gonadotropinas lo cual tiene como resultado el inicio de la pubertad.

### **INERVACIÓN DEL OVARIO**

Generalmente se asume que la actividad cíclica del ovario, la síntesis de esteroides, el crecimiento folicular, la selección de los folículos preovulatorios y la ovulación están controlados hormonalmente por el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. Sin embargo, estudios de diversos autores permiten sugerir que, además de las gonadotropinas y de las hormonas ováricas, la inervación del propio ovario participa en la regulación de varios aspectos de su función, modulando su reactividad a la acción de las gonadotropinas y enviando información de su funcionamiento hacia el SNC, donde el conjunto de informaciones es procesada por el hipotálamo y tiene como resultado, la modificación de la secreción de la GnRH (Burden, 1985; Domínguez y Riboni, 1971).

Estudios anatómicos e histológicos describen que la inervación del ovario en los mamíferos es de tipo peptidérgico, colinérgico y adrenérgico, (Burden, 1978). La inervación de tipo peptidérgica llega al ovario por el plexo ovárico nervioso y por el nervio ovárico superior (NOS). Las fibras del neuropéptido Y (NPY) se localizan alrededor de los vasos sanguíneos, en la glándula intersticial y entre los folículos (McDonald y col., 1987; Pitzel y col., 1991; Sahu y col., 1992). Las fibras nerviosas que transportan a la sustancia P se localizan en asociación con la teca interna de folículos en crecimiento y en contacto con las arteriolas ováricas (Dees y col., 1986; Pitzel y col., 1991), mientras que el NOS transporta las fibras del VIP. Estas se localizan asociadas a pequeñas arterias y a los folículos primordiales, pero se encuentran frecuentemente en la teca interna de folículos antrales, en la glándula intersticial y en contacto con las venas de la túnica adventicia (Ahmed y col., 1986).

El Sistema colinérgico del hipotálamo es uno de los sistemas de neurotransmisión que regula la secreción de las gonadotropinas. Estudios previos han sugerido que este sistema participa en forma asimétrica en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación, la cual varía durante el ciclo estral de la rata. Por lo tanto, se sugiere que los mecanismos neuroendócrinos vinculados al sistema colinérgico que regulan la ovulación, están relacionados con la información neural que proviene de los ovarios y que llega a SNC (Cruz, 1990).

El ovario de la rata posee inervación adrenérgica abundante. Los nervios adrenérgicos que llegan al ovario provienen del plexo ovárico y del NOS; éste último corre a lo largo del ligamento suspensorio. Las fibras del plexo ovárico siguen el trayecto de la arteria ovárica y juntas penetran por el hilio del ovario y llegan a las células del tejido muscular liso que rodea a la teca follicular externa, a la glándula intersticial y continua a lo largo de los vasos sanguíneos. Las fibras noradrenérgicas están presentes en todos los estados de desarrollo del folículo, pero no entran en contacto con las células de la granulosa o del cuerpo lúteo (Burden, 1978; Lawrence y Burden, 1980; Neilson y col., 1970). En la rata se ha sugerido que esta inervación aparece en el ovario a los 16 días de vida fetal (Ojeda y col., 1986).

Las catecolaminas que actúan sobre el ovario tienen cuatro orígenes: las circulantes, producidas en la médula suprarrenal (adrenalina); las liberadas en las terminaciones nerviosas adrenérgicas (noradrenalina); las sintetizadas por las células de la granulosa (noradrenalina) y las secretadas por las células cromoadrenérgicas (Domínguez y col., 1991).

La participación de la inervación del ovario en la regulación de su función ha sido estudiada utilizando diferentes metodologías, que incluyen la medición de las concentraciones de neurotransmisores y los efectos de la desnervación, tanto quirúrgica como farmacológica:

Así, se ha demostrado que además de las terminales nerviosas catecolaminérgicas, el ovario presenta receptores adrenérgicos específicos del subtipo  $\beta$ -2, los cuales están presentes en las células de la granulosa y de la teca externa. 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 (Aguado y Ojeda, 1984).

En la rata prepúber la sección unilateral del NOS provoca disminución en el contenido de noradrenalina ovárica, lo cual se acompaña de un incremento temporal del contenido del neurotransmisor en el ovario inervado. Esta falta de información provoca modificaciones del contenido de noradrenalina ovárica que dependen del ovario que se manipule, de la edad en la que se elimine la inervación y del tiempo postdesnervación en que se observen los resultados (González, 1994).

Morales y col. (1993) encontraron que el NOS participa estimulando la primera ovulación espontánea en la rata prepúber y que dicha participación es ipsilateral. En animales de 24 días de edad, la sección bilateral del NOS provoca disminución del contenido de noradrenalina ovárica, sin modificar la edad de la pubertad ni de la primera ovulación. Estos resultados sugieren que las fibras noradrenérgicas que llegan al ovario por esta vía, regulan de manera estimulante la capacidad de síntesis de hormonas esteroideas, mientras que las

modificaciones en la cantidad de receptores  $\beta$ -adrenérgicos que se presentan en el ovario del animal prepúber, facilitarían su respuesta a las gonadotropinas (Aguado y Ojeda, 1984a, 1984b).

La desnervación farmacológica se ha realizado por la administración de drogas que pueden potenciar o bloquear el estímulo del neurotransmisor en la sinapsis.

Además de modular la respuesta de las células tecales y de la granulosa a la FSH y la LH, la noradrenalina participaría en los mecanismos que regulan el crecimiento y diferenciación folicular y la ovulación. En el animal adulto, la desnervación catecolaminérgica, provocada por la administración de reserpina, 3 horas antes de la administración de FSH, aumenta la respuesta ovulatoria, el peso de los ovarios y disminuye el número de folículos preovulatorios y no modifica la respuesta a la LH (Chávez y col., 1987). En cambio, en el animal prepúber, el bloqueo noradrenérgico disminuye los efectos de la LH y no afecta los de la FSH (Dominguez y col., 1983; France, 1979). Las alteraciones del proceso ovulatorio se acompañan de modificaciones de la población folicular en el animal adulto, lo que no se observa en el animal prepúber. Los cambios en el ovario debidos al aumento en la respuesta a la FSH parecen ser transitorio, ya que el bloqueo del sistema catecolaminérgico con reserpina al comienzo del ciclo (que no es seguido por el estímulo con la FSH), provoca bloqueo de la ovulación y aumento de los folículos preovulatorios (Dominguez y col., 1985).

La guanetidina (GTD) es un bloqueador noradrenérgico exclusivamente periférico, ya que no atraviesa la barrera hemato-encefálica, por lo que los efectos observados serían en principio la resultante de la falta de comunicación nerviosa entre el ovario y el SNC (Nickerson y Collier, 1978; Rodríguez, 1984, Lefkowitz, y col., 1991).

La GTD se dirige particularmente a la neurona noradrenérgica periférica donde inhibe la función simpática. El compuesto llega al interior de la neurona por transporte activo, que se realiza mediante la recaptura de la noradrenalina. Posteriormente, la GTD induce la depleción de la noradrenalina neuronal (Fig. 2).

En cierta forma, la GTD recuerda a un "falso neurotransmisor", ya que está presente en las vesículas de almacenamiento, induce la depleción del trasmisor normal y es liberada por estímulos que normalmente liberan a la noradrenalina (Shand y col., 1973). Durante el bloqueo de las neuronas noradrenérgicas con GTD, las células efectoras adquieren una supersensibilidad a la noradrenalina, similar a la producida por la desnervación simpática posganglionar. La biodisponibilidad de la guanetidina es baja y variable, el agente es transportado rápidamente a su sitio de acción intraneuronal, desde donde es eliminado con una vida media de 5 días. Alrededor del 50% del fármaco es metabolizado y el resto se excreta sin modificaciones por la orina (Goodman y Gilman 1991).

Otro fármaco empleado para provocar la desnervación noradrenérgica es la 6-hidroxi dopamina (6-OHDA) la cual actúa como un neurotóxico que destruye las terminales axónicas y provoca de esta manera daños similares a los de la GTD (Angeletti y col., 1972). Diversos autores han sugerido que la administración crónica de GTD o 6-OHDA trae como consecuencia una lesión irreversible del ganglio simpático y una inmunosimpatectomía, por lo cual existe una destrucción de las neuronas simpáticas (Jaim-Etcheverry y Zieher, 1971; Johnson Jr. y col., 1976; Angeletti y col., 1972). Sin embargo, otros investigadores han demostrado que la GTD causa una degeneración selectiva de las neuronas noradrenérgicas (Evans y col., 1979; Heath y Burnstock, 1977; Evans y Burnstock, 1979).

La participación de la inervación noradrenérgica periférica en la regulación del proceso de la pubertad espontánea, al parecer es diferente entre la rata y el ratón. Mientras que en el ratón hembra la desnervación inducida por la administración de la GTD no modificó la edad de la apertura vaginal (Rosas y col., 1989), el mismo tratamiento en la rata prepúber, provocó retraso de la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal. (Flores y col. 1990). Lara y col (1990a) también encontraron que administrando GTD en las ratas a partir de los 7 días de edad, durante tres semanas, provocó un retraso en la edad de la apertura vaginal, del primer diestro, aciclicidad vaginal, retraso en el crecimiento folicular y una disminución en el número total de folículos.

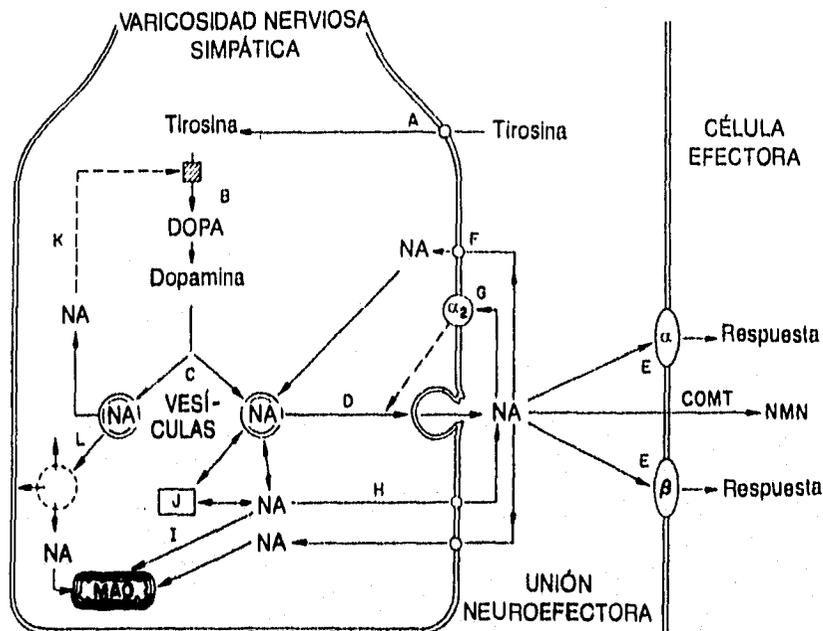


Fig. 2 Acontecimientos propuestos del modelo de una unión neuroefectora simpática: La tirosina es transportada activamente al axoplasma (A) y es convertida a dopa y luego a dopamina por enzimas citoplasmáticas (B). La dopamina es transportada a las vesículas de la varicosidad, donde tiene lugar la síntesis y el almacenamiento de la noradrenalina (NA) (C). Un potencial de acción provoca el ingreso de  $Ca^{++}$  en la terminal nerviosa (no se muestra), con posterior fusión de la vesícula con la membrana plasmática y exocitosis de NA (D). El neurotransmisor activa luego los receptores  $\alpha$  y  $\beta$  en la membrana de la célula postsináptica (E). Es probable que la NA que penetra en estas células (captación 2) se inactiva rápidamente por la Catecol-O-metiltransferasa (COMT) a normetanefrina (NMN). El mecanismo más importante para la terminación de la acción de la NA en el espacio sináptico es por recaptación activa en el nervio (captación 1) y las vesículas de almacenamiento (F). La noradrenalina en la hendidura sináptica también puede activar los  $\alpha$  a sus propios receptores presinápticos ( $\alpha_2$ ) (G), cuyo resultado es la mayor inhibición de la liberación exocitótica de noradrenalina (línea de puntos). Los sitios de acción algunas drogas en la figura incluyen: 1. Inhibición del almacenamiento vesicular de NA por la reserpina y, en parte, por la guanetidina (L). La NA liberada así es inactivada normalmente por la MAO. La guanetidina también bloquea el potencial de acción con la liberación de NA. (Goodman y Gilman 1991).

Esto sugirió que la inervación noradrenérgica periférica tiene un papel de tipo estimulante en la regulación del proceso de la esteroidogénesis y sobre la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal (Flores y col., 1990) ya que diversos autores han demostrado que la inervación catecolaminérgica ovárica modula la capacidad esteroidogénica del órgano y su respuesta ovulatoria a las gonadotropinas (Aguado y col., 1982; Ojeda y col., 1983).

Respecto a la respuesta ovulatoria, es posible argumentar que la participación de la inervación noradrenérgica periférica es diferente en la rata prepúber y la adulta, ya que en el animal adulto desnervado de manera crónica o aguda hay una disminución del número de ovocitos liberados, mientras que, en el animal prepúber la respuesta al mismo tratamiento se invierte. Con base en estos resultados, se sugiere que el papel de la inervación noradrenérgica ovárica sobre la respuesta ovulatoria, es de tipo estimulante en el animal adulto (Ayala y Domínguez, 1988; Domínguez y Zipitúa, 1980), e inhibitoria en el prepúber (Flores y col., 1990).

También se han realizado estudios para dilucidar el papel de la inervación noradrenérgica durante la etapa fetal, realizando la desnervación crónica ó aguda con GTD durante la preñez. Los resultados sugirieron que la inervación catecolaminérgica no es "fundamental" para el mantenimiento de la preñez y el desarrollo de los fetos ya que no modificó su duración, ni el tamaño de la camada. La eliminación de la información noradrenérgica en la etapa fetal tampoco modificó la primera ovulación, sin embargo, participa en el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico. En lo que respecta a la apertura vaginal, la inervación catecolaminérgica presente ya desde la etapa fetal, participa de forma estimuladora (Quiróz, 1994).

Lara y col., (1990) han realizado inmunosimpatectomía en la rata recién nacida con la administración de anticuerpos al factor de crecimiento neural (NGF Ab) y encuentran que no modifica la edad de la apertura vaginal, pero sí el de la primera ovulación. Estos resultados indican que el desarrollo de la inervación simpática en el ovario es dependiente del factor de crecimiento neural y este contribuye a la maduración de la función del ovario.

### **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Con base en algunos resultados experimentales descritos anteriormente se puede sugerir que durante la fase infantil de la rata hembra la respuesta ovulatoria inducida por vía hormonal, con estrógenos o gonadotropinas, no es estimulada debido a los efectos inhibitorios de los mecanismos neuroendócrinos presentes. Con base a la modulación que ejerce la inervación noradrenérgica sobre la respuesta ovulatoria espontánea, se puede sugerir que si eliminamos la información neural noradrenérgica que llega a los ovarios, se estimularía la ovulación y que la magnitud de la respuesta va a depender de la edad del animal en estudio. Para comprobarlo, se decidió estudiar la capacidad de respuesta del ovario de la rata prepúber con desnervación noradrenérgica periférica (provocada por la inyección de guanetidina desde el nacimiento), a la administración de las gonadotropinas o estrógenos a diferentes edades de la fase infantil de la rata.

### **HIPÓTESIS**

Dentro de los mecanismos neuroendócrinos que regulan el proceso de la pubertad, el sistema noradrenérgico ovárico regula de manera inhibitoria la sensibilidad de los folículos a las gonadotropinas. Por lo tanto, si se elimina esa fuente de información neural, la capacidad de respuesta ovulatoria inducida durante la fase infantil en los animales desnervados aumentará conforme la edad de los animales.

### **OBJETIVO GENERAL**

Estudiar la capacidad de respuesta ovulatoria de los ovarios de la rata con deservación noradrenérgica periférica a la administración de gonadotropinas o estrógenos durante la fase infantil.

### **OBJETIVOS PARTICULARES**

I.- Estudiar la reactividad de los ovarios de la rata con deservación noradrenérgica periférica a la administración de las gonadotropinas a diferentes edades de la fase infantil.

II.- Estudiar la reactividad de los ovarios de la rata con deservación noradrenérgica periférica a la administración de estrógenos a diferentes edades de la fase infantil.

## **MATERIALES Y METODO.**

Se utilizaron ratas hembra de la cepa C II Z-V de diferentes edades, mantenidas en fotoperíodo controlado de 14 horas de luz (05:00-19:00 h) y 10 horas de oscuridad; con acceso libre a la leche materna hasta los 21 días de edad (día del destete) y luego de este tiempo, tuvieron libre acceso al alimento y al agua.

Grupos de animales de 15, 18 ó 21 días de edad, fueron inyectados por vía subcutánea entre las 09:00 y 11:30 h. con: 1) 10 µg de benzoato de estradiol (BE) [Sigma Chemical Co., St Louis Mo., EE:UU], 2) 8 u.i. de gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG) [Sigma Chemical Co. ] ó 3) 8 u.i. de PMSG y 56 horas más tarde con 10 u.i. de gonadotropina coriónica humana (hCG) [Sigma Chemical Co.].

Otros grupos de animales fueron tratados con guanetidina por vía subcutánea entre las 09:00 y 11:30 h. (GTD: 20 mg /Kg peso corporal) [Sigma Chemical Co.] a partir del nacimiento, de lunes a viernes, hasta el día del primer estro vaginal. A los 15, 18 ó 21 días de edad estos animales fueron sometidos a los mismos tratamientos experimentales que los grupos antes mencionados (BE, PMSG o PMSG-hCG).

Diariamente se revisó la vagina de todos los animales hasta el día en que se abrió, día que fue considerado como el momento de la pubertad. En aquellos que presentaron apertura vaginal se tomaron frotis vaginales diariamente y los animales fueron sacrificados en el día del primer estro vaginal.

Como grupo testigo absoluto se utilizaron animales sin tratamiento, cuyos resultados fueron comparados con los obtenidos de animales inyectados con vehículo (solución salina al 0.9%). Estos últimos a su vez fueron comparados con los resultados de los animales inyectados con los diferentes tratamientos hormonales o desnervados con remplazo hormonal.

## **PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA**

Los animales fueron sacrificados por sobredosis de cloroformo. A la autopsia se disecaron los oviductos y se buscó la presencia de ovocitos, los que fueron contados en un microscopio estereoscópico. Se disecaron los ovarios y el útero, los que fueron pesados en balanza de precisión de 0.1 mg. El peso de los órganos se expresó en miligramos por cada 100 gramos de peso corporal (peso relativo).

Los ovarios que se utilizaron para el estudio histológico fueron fijados en solución de Bouin e incluidos en parafina; fueron cortados de manera seriada a 10  $\mu$ m, y teñidos con hematoxilina-eosina para analizar la presencia de cuerpos lúteos.

## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO DE LOS RESULTADOS**

Los resultados del número de ovocitos, de la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida de la prueba "U" de Mann-Withney.

Los resultados del peso de los órganos fueron comparados por análisis de varianza multifactorial (ANDEVA) seguido por la prueba de Tukey. En los casos en que se compararon dos grupos se utilizó la prueba de "t" de Student.

La tasa de animales ovulantes (número de animales que ovularon al primer estro del total de animales tratados) fue evaluada por la prueba de probabilidad exacta de Fisher.

En todos los casos sólo se aceptaron como significativas aquellas diferencias en las que la probabilidad fue igual o menor al 5%.

## **RESULTADOS**

### **Experimento 1.-**

**Estudio de los efectos del estímulo estrogénico en la fase infantil, sobre la edad de la apertura vaginal, el primer estro, la ovulación y el peso de los órganos, de animales testigos y con deservación noradrenérgica ovárica.**

Con el propósito de conocer si la falta de ovulación inducida en edades dentro de la fase infantil de la rata, es consecuencia de: 1) la deficiencia en la producción endógena de estrógenos ó 2) falta de respuesta del hipotálamo o la hipófisis a los estrógenos, se analizaron los efectos del remplazo de esta hormona en animales deservados con guanetidina desde el nacimiento.

Para ello, grupos de animales de 15, 18 ó 21 días de edad, testigos y deservados con GTD fueron inyectados con 10 µg BE y sacrificados al primer estro vaginal.

### 1.1 - Animales testigos tratados con Estrógenos:

El tratamiento con estrógenos adelantó la edad de la apertura vaginal en los animales tratados a los 15 días ( $20.3 \pm 0.3$  días), 18 días ( $21.3 \pm 0.3$ ) y 21 días de edad ( $24.4 \pm 0.3$ ), respecto a los animales sin tratamiento:  $41.4 \pm 1.1$ , ( $P < 0.001$ ). El tratamiento con BE también adelantó la edad del primer estro vaginal (Fig 3).

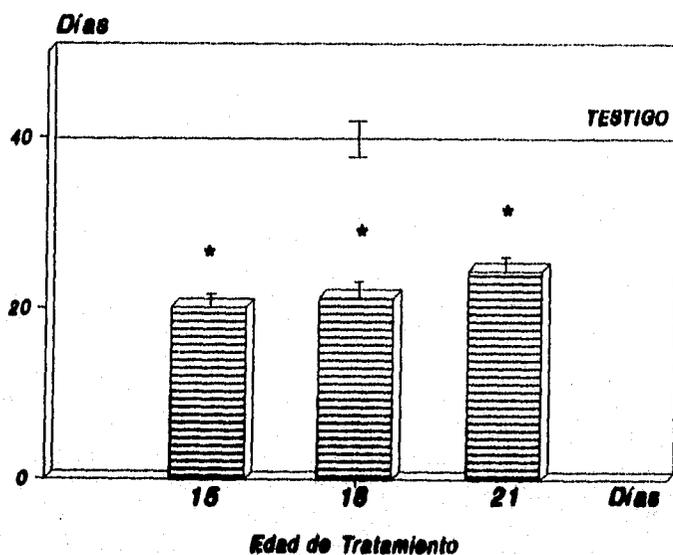


Fig. 3: Media  $\pm$  e.e.m. de la edad del primer estro vaginal (PEV) de los animales tratados con  $10 \mu\text{g}$  de BE a los 15, 18 ó 21 días de edad, sacrificados en el día del PEV. \*  $P < 0.01$  vs animales sin tratamiento (Testigo) sacrificado en el día del PEV. (Kruskal-Wallis, seguida de la prueba "U" de Mann-Whitney).

Los resultados de la tasa ovulatoria, el peso corporal, de los ovarios y el útero se muestran en la tabla 1. Ninguno de los animales ovuló y no se observaron diferencias significativas en el peso corporal. En todos los animales

tratados con BE el peso del útero aumentó significativamente. La masa ovárica disminuyó de manera significativa en ratas tratadas a los 21 días.

**TABLA 1: Tasa Ovulatoria (T.O), media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal (P.C.) y del peso relativo (mg/100g) de los órganos de los animales tratados con 10  $\mu$ g de BE a los 15, 18 ó 21 días de edad, sacrificados en el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	T.O.	P.C. (g)	Masa Ovárica (mg/100g)	Útero (mg/100g)
Testigo &	0/8	39.9 $\pm$ 0.9	46.4 $\pm$ 4.5	72.0 $\pm$ 6.74
BE-15	0/8	43.4 $\pm$ 2.4	37.4 $\pm$ 3.4	122.2 $\pm$ 8.2*
Testigo $\phi$	0/8	45.6 $\pm$ 1.5	47.7 $\pm$ 2.0	67.5 $\pm$ 3.8
BE-18	0/8	41.5 $\pm$ 2.8	51.6 $\pm$ 3.8	218.7 $\pm$ 23.8*
Testigo $\blacktriangle$	0/8	44.3 $\pm$ 1.3	52.6 $\pm$ 3.4	90.5 $\pm$ 6.2
BE-21	0/8	45.9 $\pm$ 1.7	36.4 $\pm$ 3.6*	151.2 $\pm$ 16.4*

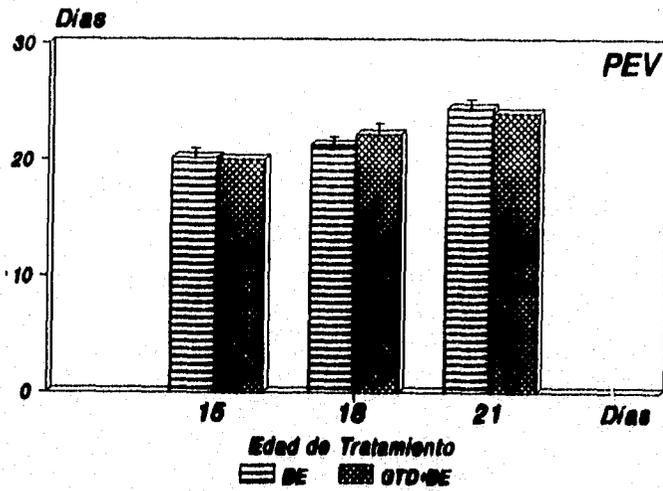
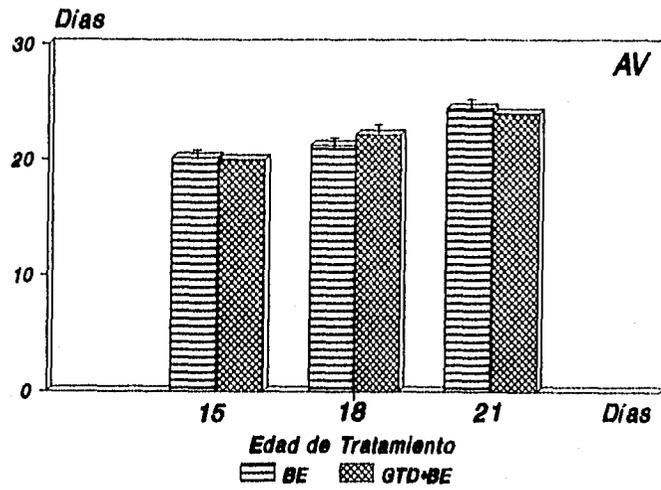
& Testigo sacrificado a los 20.3 $\pm$ 0.3 días de edad;  $\phi$  Testigo sacrificado a los 21.3 $\pm$ 0.3 días de edad;  $\blacktriangle$  Testigo sacrificado a los 24.4 $\pm$ 0.3 días de edad.

\* P<0.001 respecto al grupo Testigo Correspondiente ("t" de Student).

## 1.2- Animales desnervados tratados con estrógenos.

En comparación con los animales tratados con estrógenos, al tratamiento estrogénico a ratas desnervadas desde el nacimiento no provocó modificaciones en la edad de la apertura vaginal (pubertad), ni en la del primer estro (Fig 4). Ninguno de los animales ovuló y su peso corporal fue semejante al de los animales tratados solamente con la hormona (Fig. 5).

En los animales desnervados, tratados con estrógenos a los 15 días de edad, el peso de los ovarios disminuyó significativamente mientras que aumentó en las ratas tratadas a los 21 días. El peso del útero disminuyó significativamente en los animales tratados a los 16 días de edad y aumentó en los que recibieron estrógenos a los 21 días (Fig 6).



**Fig. 4:** Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV) y la del primer estro vaginal (PEV) de los animales con o sin deservación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 10  $\mu$ g de BE, sacrificados en el día del primer estro vaginal.

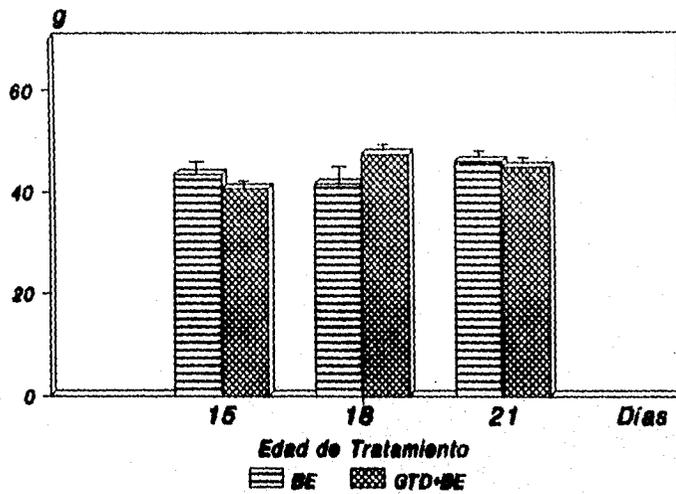


Fig. 5: Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal de los animales con o sin deservación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 10  $\mu$ g de BE, sacrificados en el día del primer estro vaginal.

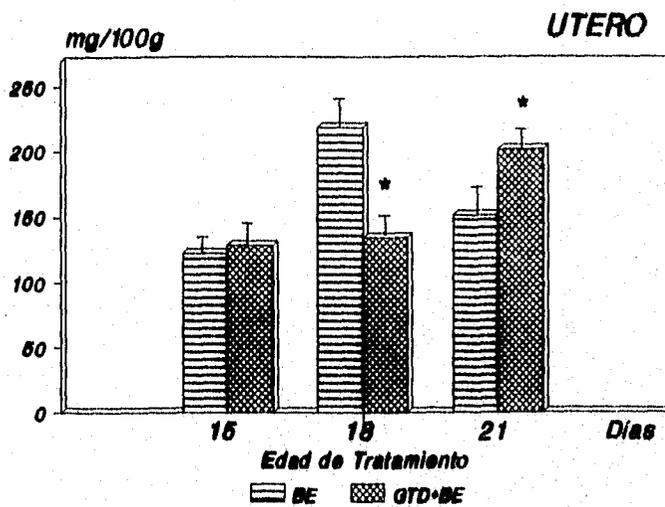
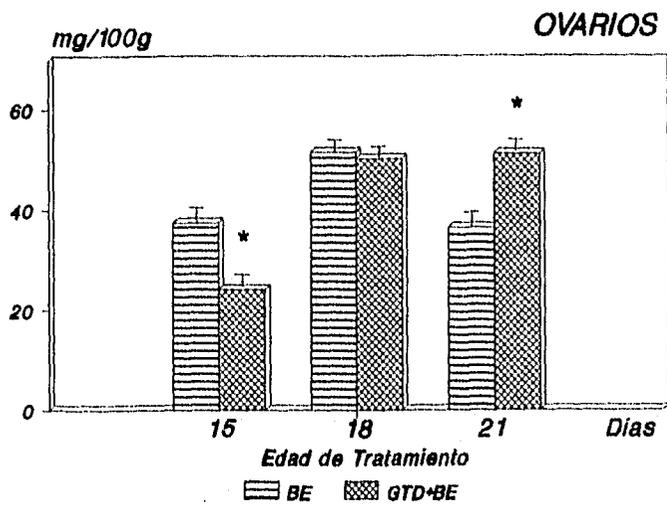


Fig. 6: Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de los animales con o sin deservación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 10  $\mu$ g de BE, sacrificados en el día del primer estro vaginal. \*  $P < 0.001$  vs BE, ("t" de Student).

## Experimento 2.-

Estudio de los efectos del estímulo gonadotrópico con PMSG en la fase infantil, sobre la edad de la apertura vaginal, el primer estro, la ovulación y el peso de los órganos, de animales testigos y con deservación noradrenérgica ovárica.

Con la finalidad de saber si la falta de ovulación observada en el experimento anterior es consecuencia de deficiencia en la secreción de FSH o de una falta de respuesta del ovario a ella, animales testigos y deservados con GTD desde el nacimiento, fueron inyectados con 8 u.i. de PMSG y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

## 2.1 - Animales testigos tratados con PMSG:

La administración de PMSG provocó adelanto en la edad de la apertura vaginal. En los animales tratados a los 15 días, la apertura vaginal se presentó a los  $20.8 \pm 0.3$ ; en los inyectados a los 18 días se observó a los  $22.0 \pm 0.0$  días de edad, y la aplicación de la hormona a los 21 días provocó que la pubertad ocurriera a los  $24.5 \pm 0.3$  días respecto a los animales sin tratamiento:  $41.4 \pm 1.1$ , ( $P < 0.001$ ). El tratamiento con PMSG también adelantó la edad del primer estro vaginal (Fig. 7).

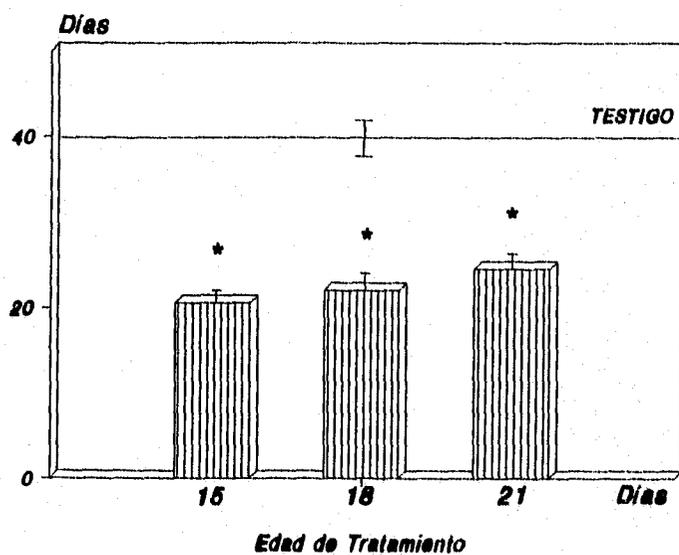


Fig. 7: Media  $\pm$  e.e.m. de la edad del primer estro vaginal (PEV) de los animales tratados con 8 u.l. de PMSG a los 15, 18 ó 21 días de edad y sacrificados en el día del PEV. \*  $P < 0.01$  vs animales sin tratamiento sacrificado en el día del PEV. (Kruskal-Wallis, seguida de la prueba "U" de Mann-Whitney).

Los resultados de la tasa ovulatoria, el peso corporal, de los ovarios y el útero se muestran en la Tabla 2. En los oviductos de estos animales no se observó la presencia de ovocitos al momento de la autopsia. Sin embargo, en los ovarios de dos de los ocho animales tratados a los 18 ó 21 días se observaron cuerpos lúteos recién formados.

El peso del útero aumentó significativamente en todos los animales tratados. Solamente en los animales tratados a los dieciocho días, aumentó significativamente el peso de los ovarios.

El peso corporal se modificó en función de la edad en la que se realizó el tratamiento.

**TABLA 2: Tasa Ovulatoria (T.O), media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal (P.C.) y del peso relativo (mg/100g) de los órganos de los animales tratados con 8 u.l. de PMSG a los 15, 18 ó 21 días de edad y sacrificados en el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	T.O.	P.C. (g)	Masa Ovárica (mg/100g)	Útero (mg/100g)
Testigo &	0/8	40.2 $\pm$ 1.0	47.7 $\pm$ 4.7	71.4 $\pm$ 7.3
PMSG-15	0/8	44.3 $\pm$ 2.8	37.4 $\pm$ 3.4	141.3 $\pm$ 19.4*
Testigo $\phi$	0/8	49.4 $\pm$ 1.7	47.5 $\pm$ 1.9	72.3 $\pm$ 3.0
PMSG-18	2/8	42.6 $\pm$ 2.2*	91.4 $\pm$ 13.7*	307.7 $\pm$ 25.6*
Testigo $\blacktriangle$	0/8	43.9 $\pm$ 1.4	53.0 $\pm$ 2.5	88.6 $\pm$ 6.3
PMSG-21	2/8	53.1 $\pm$ 3.2*	70.0 $\pm$ 18.9	219.8 $\pm$ 21.9*

& Testigo sacrificado a los 20.8 $\pm$ 0.3 días de edad;  $\phi$  Testigo sacrificado a los 22.0 $\pm$ 0.0 días de edad;  $\blacktriangle$  Testigo sacrificado a los 24.5 $\pm$ 0.3 días de edad.

\* P<0.001 respecto al grupo Testigo Correspondiente ("t" de Student).

## 2.2- Animales desnervados tratados con PMSG:

La desnervación noradrenérgica no modificó la edad de la pubertad, ni la del primer estro vaginal respecto a los animales que sólo recibieron el tratamiento hormonal (Fig.8).

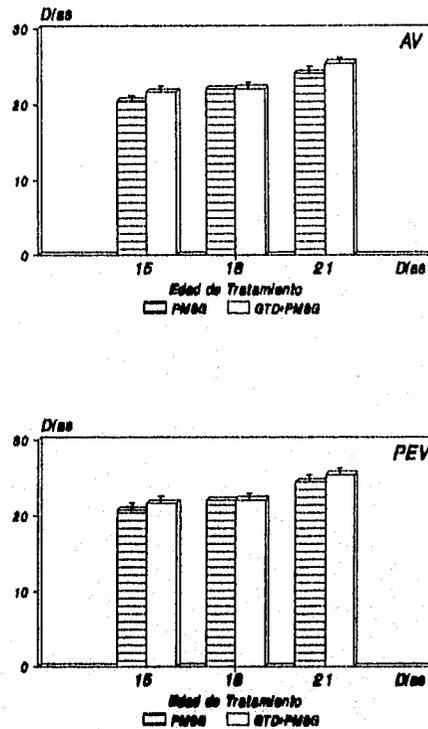


Fig. 8: Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV) y la del primer estro vaginal (PEV) de los animales con o sin desnervación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.i. de PMSG, sacrificados en el día del primer estro vaginal.

En ninguno de los animales desnervados tratados con PMSG se observó la presencia de ovocitos en los oviductos al momento de la autopsia. Sin embargo, al realizar el estudio histológico de los ovarios, se observó que cinco de los nueve animales tratados a los 18 ó 21 días presentaron cuerpos lúteos recién formados (5/9 vs 2/8 de los tratados con PMSG, NS).

El peso corporal y el de los ovarios de los animales desnervados tratados a los 15 ó 18 días de edad, no se modificó significativamente respecto a los que sólo recibieron PMSG (Figs. 9 y 10).

Cuando se analizaron los resultados del peso relativo del útero de los animales desnervados tratados con PMSG a los 15, 18 ó 21 días no se observaron diferencias significativas respecto a los que sólo recibieron el estímulo hormonal (Fig 10). Sin embargo, cuando se analizaron los resultados ponderales (absolutos) se observó que sólo en los de 18 días de edad disminuyó significativamente el peso de los ovarios y del útero (Fig. 11). Esto significa que la falta de diferencias en los pesos relativos se explica por efecto del peso corporal.

En cambio, en los animales desnervados tratados con PMSG a los 21 días, el peso corporal disminuyó significativamente y aumentó significativamente el de los ovarios (Figs. 9 y 10). Cuando los resultados se expresaron como pesos absolutos, el peso del útero disminuyó significativamente (Fig. 11). Las diferencias observadas se explican por efecto del peso corporal.

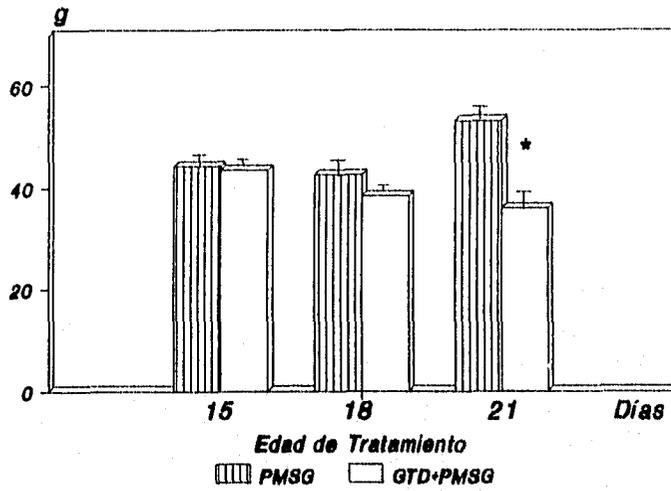


Fig. 9: Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal de los animales con o sin deservación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.l. de PMSG, sacrificados en el día del primer estro vaginal.

\*  $P < 0.001$  vs PMSG ("t" de Student).

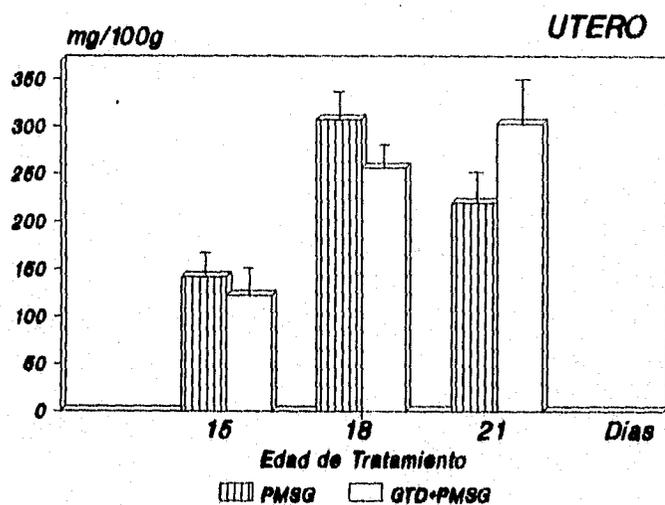
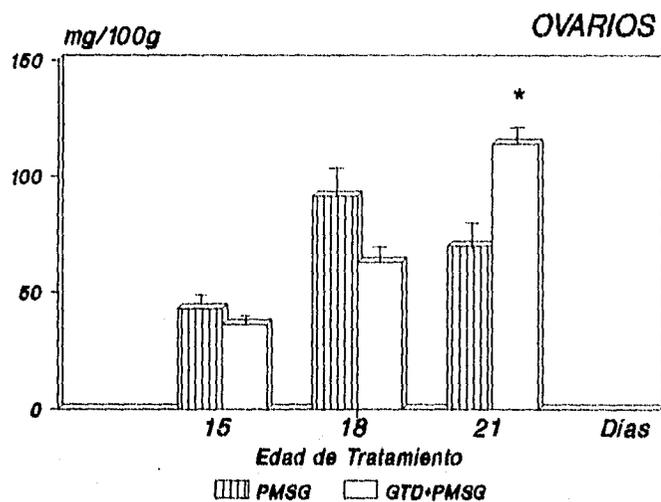
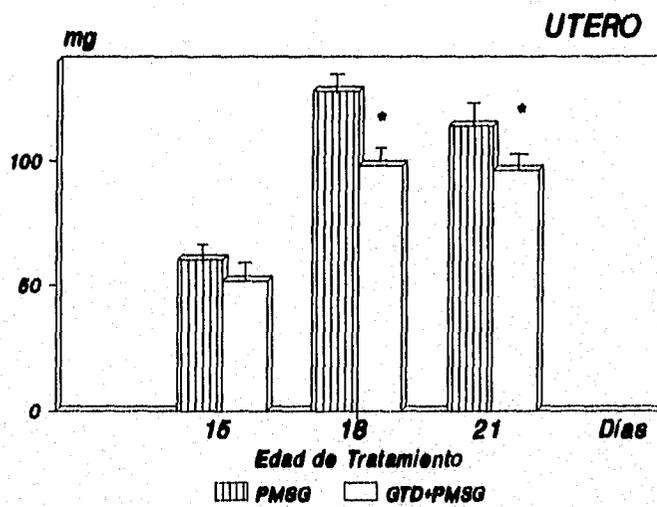
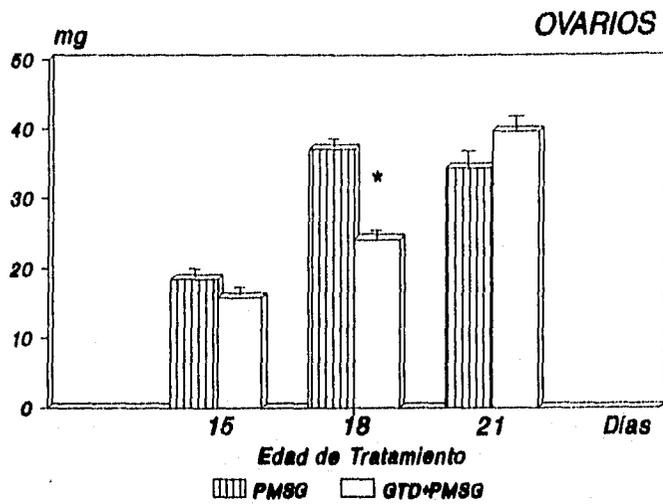


Fig. 10: Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) con o sin deservación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.i. de PMSG, sacrificados en el día del primer estro vaginal. \*  $P < 0.05$  vs PMSG ("t" de Student).



**Fig. 11: Media  $\pm$  e.s.m. del peso absoluto de los ovarios y del útero de los animales con o sin deservación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.i. de PMSG, sacrificados en el día del primer estro vaginal. \* $P < 0.001$  vs PMSG ("T" de Student).**

**Experimento 3.-**

**Estudio de los efectos del estímulo gonadotrópico secuencial con PMSG-hCG en la fase infantil sobre la edad de la apertura vaginal, el primer estro, la ovulación y el peso de los órganos, de animales testigos y con deservación noradrenérgica ovárica.**

Con el fin de analizar si la falta de ovulación observada en el experimento anterior es consecuencia de una alteración en la respuesta del ovario a las gonadotropinas, los animales testigos y deservados con GTD desde el nacimiento, fueron inyectados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.i. de PMSG y 56 horas más tarde con 10 u.i. de hCG.

### 3.1 - Animales testigos tratados con PMSG-hCG:

El tratamiento hormonal con PMSG-hCG adelantó la edad de la apertura vaginal en los animales tratados a los 15 días ( $20.9 \pm 0.3$ ), 18 días ( $22.0 \pm 0.0$ ) y 21 días de edad ( $24.8 \pm 0.3$ ) respecto a los animales sin tratamiento:  $41.4 \pm 1.1$ , ( $P < 0.001$ ), y también adelantó la edad del primer estro vaginal (Fig.12).

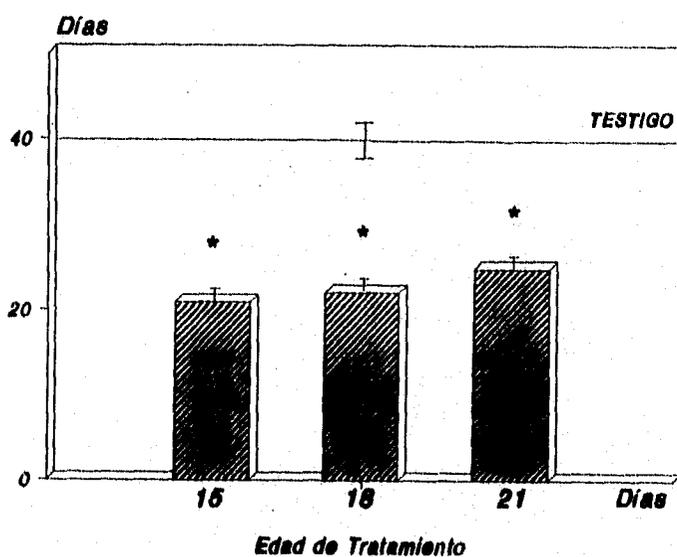


Fig. 12: Media  $\pm$  e.e.m. de la edad del primer estro vaginal (PEV) de los animales tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.i. de PMSG y 56 horas más tarde con 10 u.i. de hCG, sacrificados en el día del PEV.\*  $P < 0.01$  vs animales sin tratamiento sacrificado en el día del PEV. (Kruskal-Wallis, seguida de la prueba "U" de Mann-Whitney).

En los oviductos de las ratas inyectadas a los 15 o 18 días de edad, no se observó la presencia de ovocitos. El estudio histológico de los ovarios de los animales tratados a los 18 días reveló la presencia de cuerpos lúteos recién formados en tres de los ocho animales tratados.

En cambio, dos de los ocho animales tratados a los 21 días de edad ovularon, los que liberaron 10 y 16 ovocitos respectivamente. Al efectuar el análisis histológico de los ovarios de estos animales, se observó la presencia de cuerpos lúteos recién formados en otros dos animales en los que no se encontraron ovocitos en las trompas.

El peso corporal de los animales tratados a cualquiera de las edades fue similar al de sus respectivos testigos. El peso de los ovarios aumentó significativamente en los animales tratados a los 18 y 21 días de edad, mientras que el peso del útero se incrementó significativamente en todos los animales tratados (Tabla 3).

**TABLA 3: Tasa Ovulatoria (T.O), media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal (P.C.) y del peso relativo (mg/100g) de los órganos de los animales tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.i. de PMSG y 56 horas más tarde con 10 u.i. de hCG, sacrificados en el día del primer estro vaginal.**

GRUPO	T.O.	P.C. (g)	Masa Ovárica (mg/100g)	Útero (mg/100g)
Testigo &	0/8	40.0 $\pm$ 1.0	51.8 $\pm$ 3.2	77.7 $\pm$ 7.1
PMSG-hCG15	0/8	41.6 $\pm$ 1.7	60.7 $\pm$ 6.6	197.7 $\pm$ 17.0*
Testigo $\phi$	0/8	49.4 $\pm$ 1.7	47.5 $\pm$ 1.9	72.3 $\pm$ 3.0
PMSG-hCG18	3/8	51.3 $\pm$ 1.5	71.9 $\pm$ 5.6*	125.3 $\pm$ 4.5*
Testigo $\blacktriangle$	0/8	45.1 $\pm$ 1.5	50.6 $\pm$ 2.8	83.0 $\pm$ 5.8
PMSG-hCG21	4/8	51.5 $\pm$ 2.7	186.4 $\pm$ 42.2*	156.3 $\pm$ 13.0*

& Testigo sacrificado a los 20.9 $\pm$ 0.3 días de edad;  $\phi$  Testigo sacrificado a los 22.0 $\pm$ 0.0 días de edad;  $\blacktriangle$  Testigo sacrificado a los 24.8 $\pm$ 0.3 días de edad.

\* P<0.001 respecto al grupo Testigo Correspondiente ("t" de Student).

### 3.2- Animales desnervados tratados con PMSG-hCG:

En los animales desnervados, la administración PMSG-hCG en cualquiera de las edades no modificó la edad de la apertura ni la del primer estro vaginal, comparado con los animales íntegros tratados con PMSG-hCG (Fig. 13).

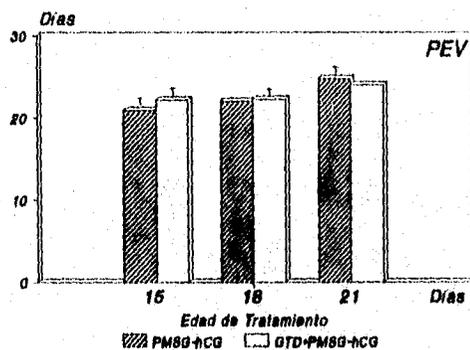
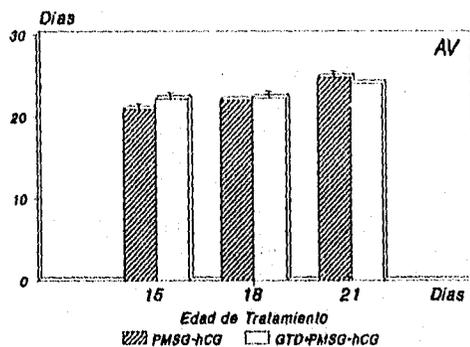


Fig. 13: Media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (AV) y la del primer estro vaginal (PEV) de los animales con o sin desnervación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.l. de PMSG y 56 horas más tarde con 10 u.l. de hCG, sacrificados en el día del primer estro vaginal.

En los animales desnervados tratados con PMSG-hCG a los 15 días, no se encontraron ovocitos en las trompas, ni cuerpos lúteos en los ovarios. Sólo dos de los ocho animales tratados a los 18 días liberaron ocho y 13 ovocitos y en los ovarios de cuatro animales más se observaron cuerpos lúteos recién formados. En cambio, en el grupo tratado a los 21 días, el 100% de las ratas ovuló (8/8 vs 4/8 de los tratados con PMSG-hCG,  $P < 0.05$ ), con un número de ovocitos de  $22.0 \pm 2.3$ .

El peso corporal de los animales desnervados al nacimiento, tratados con PMSG-hCG a los 18 días de edad, fue significativamente menor que los testigos tratados con PMSG-hCG (Fig 14).

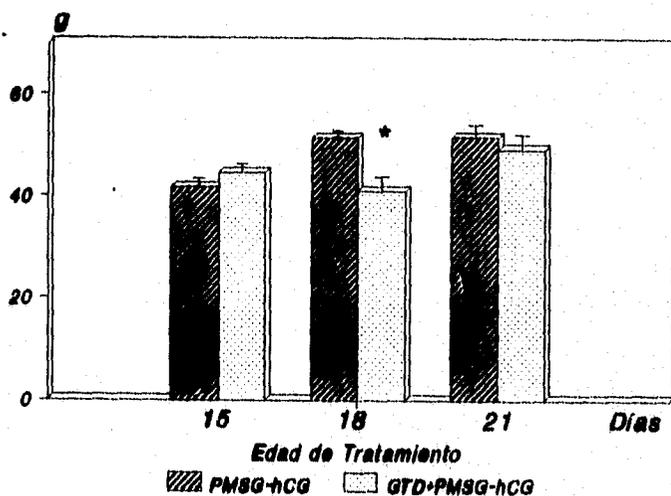


Fig. 14: Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal de los animales con o sin desnervación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.i. de PMSG y 56 horas más tarde con 10 u.i. de hCG, sacrificados en el día del primer estro vaginal. \*  $P < 0.001$  vs PMSG-hCG ("t" de Student).

El peso de los ovarios de los animales desnervados tratados a los 15 días de edad fue menor que en sus testigos, mayor en los inyectados a los 18 días y no se modificó en los animales testigos tratados a los 21 días. El peso del útero fue similar al de los animales testigos tratados con PMSG-hCG (Fig 15).

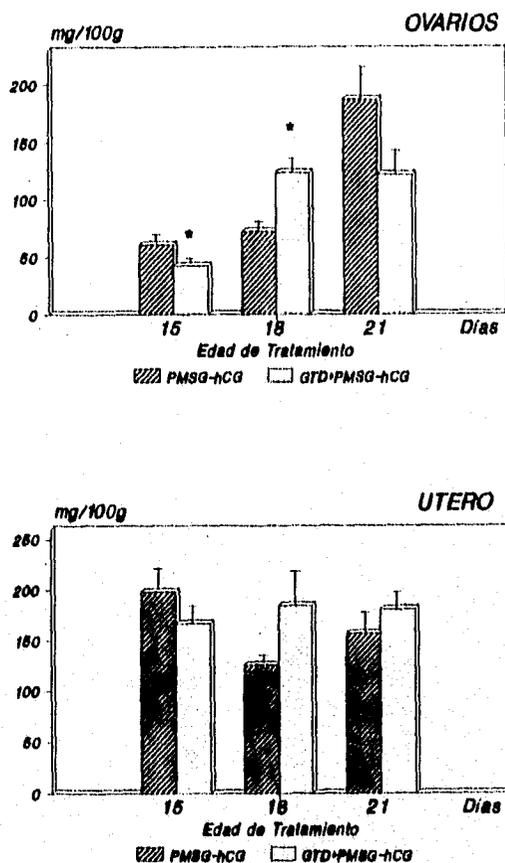


Fig. 15: Media  $\pm$  e.e.m. del peso de los ovarios y del útero (mg/100 g) de los animales con o sin deservación noradrenérgica ovárica a partir del nacimiento, tratados a los 15, 18 ó 21 días de edad con 8 u.i. de PMSG y 56 horas más tarde con 10 u.i. de hCG, sacrificados en el día del primer estro vaginal. \* $P < 0.05$  vs PMSG-hCG ("t" de Student).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio aportan nuevas evidencias sobre el papel inhibitorio que la inervación noradrenérgica periférica parece tener sobre la regulación de la respuesta ovulatoria a las gonadotropinas en la rata prepúber y nos lleva a sugerir que durante la etapa infantil dicha participación se manifiesta a partir de los 18 días de edad y es claramente evidente a los 21 días de edad.

Estudios de diversos autores han mostrado que en la rata hembra, los mecanismos neuroendócrinos que regulan la liberación de la LH ya están desarrollados en el animal al final de la fase infantil (alrededor de los 21 días), pero su manifestación en forma espontánea se produce a edad más avanzada (35-45 días), lo cual depende de la cepa del animal, factores genéticos y condiciones ambientales (Ramírez, 1973; McCormack y Meyer, 1964; y Ojeda y col., 1986)

En general, se ha mostrado que en la rata prepúber se induce el adelanto de la edad de la apertura vaginal y la primera ovulación cuando el estímulo hormonal (BE, PMSG ó PMSG-hCG) es al inicio de la fase juvenil 22 días (Ojeda y col., 1983; Villavicencio y col., 1993; Zarrow y Quinn 1963).

Diversos autores han tratado de inducir respuesta ovulatoria durante la fase infantil con diferentes tratamientos hormonales (estrógenos o gonadotropinas), en todos los casos se ha observado apertura y estro vaginal, sin signos de ovulación. Estos hechos indican que el ovario es capaz de secretar estrógenos en respuesta al estímulo hormonal, pero que el circuito de regulación de la ovulación no ha alcanzado la madurez suficiente.

Los resultados de este estudio muestran que en los animales de 15 días de edad, el estímulo gonadotrópico provoca la secreción de cantidades suficientes de estrógenos capaces de inducir el adelanto de la apertura vaginal, pero no la ovulación, lo que corroboraría la hipótesis de que a esta edad el sistema no ha alcanzado la maduración suficiente como para cerrar el circuito e indica que los

mecanismos neuroendócrinos que regulan la canalización vaginal y la ovulación son diferentes. El hecho que la desnervación noradrenérgica no modificó dicho resultado, nos lleva a sugerir que su papel en esta edad no es fundamental en la modulación de la respuesta del ovario a las gonadotropinas.

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que cuando los animales son desnervados con guanetidina a partir del nacimiento y tratados con PMSG a los 18 días de edad, se presentó la ovulación en el 44% de los animales con un promedio de  $3.5 \pm 0.6$  ovocitos liberados, lo que no se observó cuando los animales sólo fueron tratados con la gonadotropina (Flores y Domínguez, 1992).

En este estudio, en los animales desnervados y tratados con gonadotropinas a los 18 días, el adelanto de la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal acompañado de la ovulación en algunos de los animales, indica un adelanto en la maduración del sistema neuroendócrino responsable de la liberación preovulatoria de las gonadotropinas, principalmente de la LH, que no se presentó en los animales tratados a los 15 días de edad. Estos resultados apoyan que el papel de la inervación noradrenérgica periférica en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la ovulación, depende de la edad del animal en estudio (Ayala y Domínguez, 1988; Flores y col., 1990).

En esta edad el efecto estimulante de los estrógenos ha alcanzado un grado de maduración que pudiera decirse que es parecido al del animal adulto, ya que la administración de estrógenos estimuló la secreción de gonadotropinas en cantidades similares a las del proestro del animal adulto cíclico (Ojeda y col., 1983; 1986).

El hecho de que en los animales tratados con las hormonas a los 18 ó 21 días de edad, presentaron apertura vaginal y el primer estro a un tiempo más corto postadministración que los inyectados a los 15 días de edad, indica que los ovarios tuvieron mayor capacidad de secretar estrógenos y que es más sensible a los efectos hormonales que en los animales tratados a los 15 días de edad. Al parecer, la capacidad esteroidogénica de los ovarios depende del umbral de respuesta y está en función de la edad de los animales.

Diversos autores (Parker y col., 1976; Quinn y Zarrow, 1964; Sasamoto y col., 1977; Sasamoto y Johke, 1964; Welshen y Dullart, 1976; Zarrow y Wilson, 1961) han mostrado que en el animal prepúber tratado con PMSG, la liberación de la LH se produce entre las 48-60 horas después del tratamiento y la ovulación ocurre después de 10-12 horas del pico preovulatorio de LH. Otros autores han demostrado que en la rata inmadura, el evento de la ovulación se explica porque la administración de PMSG provoca la aparición de folículos mayores de 350  $\mu\text{m}$  de diámetro (folículos preovulatorios) y disminución del índice de atresia en los folículos con diámetro de 200-400  $\mu\text{m}$ . Esto a su vez estimuló que la secreción de estrógenos aumentara, trayendo como consecuencia el incremento en el peso de los ovarios y del útero y que finaliza con el cierre del círculo neuroendócrino, la liberación de GnRH y de LH para inducir la ovulación (Braw y Tsafirri, 1980; Hirsfield y Midgley, 1978a,b; Hirsfield y DePaolo, 1981; Schwartz, 1974; Welshen y Dullart, 1974, 1976).

Nuestros resultados confirman que la ovulación inducida por PMSG está en función de la edad del animal (Ramírez, 1973; Villavicencio y col., 1993; Taya y col., 1974; Zarrow y Quinn, 1963; Zarrow y Wilson 1961), ya que la tasa ovulatoria se incrementó conforme la edad de los animales. Asimismo, podemos argumentar que la reactividad de los folículos a las gonadotropinas exógenas se ve incrementada entre el final de la etapa infantil y el inicio de la etapa juvenil.

Al final de la fase infantil, entre los 21 días de edad, la capacidad del eje hipotálamo-hipófisis para que responda a las concentraciones plasmáticas de estrógenos que estimulan la secreción de LH parecida a la del proestro ya se encuentra establecida. Por otra parte, aún cuando en esta fase se presentan ondas de crecimiento y atresia folicular, los folículos preovulatorios no tienen la capacidad de ovular, lo que sugiere que la primera liberación preovulatoria de gonadotropinas y la primera ovulación no se presenta ya que la adquisición de esta capacidad está regulada por múltiples factores hormonales y neurogénicos que regula el SNC (Ojeda y col., 1983; Andrews y Ojeda, 1981).

Como se mencionó anteriormente, el aumento de la tasa de animales ovulantes y del número de ovocitos liberados por los animales que fueron

desnervados a partir del nacimiento y tratados con PMSG-hCG a los 21 días de edad, aportan nuevas evidencias de que la inervación noradrenérgica periférica regula de manera inhibitoria la acción de las gonadotropinas sobre el proceso de la ovulación. Estos resultados sugieren que se presentó la aceleración del crecimiento folicular en respuesta al aumento en las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas o aumentó la sensibilidad de los folículos a las mismas o a la combinación de ambos factores. Es posible suponer que este aumento en el número de ovocitos liberados sea el resultado de la modificación de más de un mecanismo de regulación del proceso ovulatorio (Ojeda y col., 1983; 1990).

Parker y col. (1976) han mostrado que en el animal prepúber tratado con PMSG, la secreción de estrógenos y andrógenos se inicia a las ocho horas después del tratamiento y las concentraciones plasmáticas se incrementan a las 48 horas, lo que se correlaciona con el aumento en el peso del útero. Estos hechos explicarían por que el tratamiento con las gonadotropinas en las diferentes edades incrementó el peso del útero, lo que no fue modificado por la desnervación noradrenérgica periférica.

La desnervación noradrenérgica periférica inducida por la inyección de guanetidina desde el nacimiento o en la etapa adulta, provoca disminución del peso de los ovarios (Flores y col. 1990). En el presente estudio, el estímulo hormonal con gonadotropinas o estrógenos en animales desnervados, indujo modificaciones en el peso de las gónadas que dependieron de la edad y la hormona administrada. En los animales desnervados la administración hormonal a los 15 días de edad provocó disminución del peso de las gónadas, mientras que cuando se inyectó PMSG+hCG a los 18 días, o benzoato de estradiol o PMSG a los 21 días de edad, el peso de los ovarios aumentó significativamente. Los resultados que se observaron en esas dos últimas edades, concuerden con lo encontrado por Morales y col. (1993) quienes observaron un incremento en el peso de los ovarios cuando los animales fueron sometidos a una desnervación bilateral del NOS, en la fase peripuberal, y posteriormente fueron estimulados con una o ambas gonadotropinas. Sin embargo, es necesario tener en consideración que la desnervación producida por el fármaco no es similar a lo que

sucede al seccionar un nervio ya que en éste último se encuentran más de un neurotransmisor (Burden, 1978).

Estos resultados en conjunto nos llevan a sugerir que la inervación noradrenérgica modula las acciones de las gonadotropinas y de los estrógenos sobre los ovarios.

Que el ambiente neuroendócrino de los animales es diferente en las tres edades, a pesar de que ellas pertenecen a la etapa infantil. Esto podría explicar, en parte, las diversas respuestas que se observan cuando los animales son desnervados y sometidos a los tratamientos hormonales.

Además, de los factores hormonales y la participación de la inervación noradrenérgica en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la pubertad y la ovulación inducida, la madurez del animal es un factor clave para la expresión de los eventos.

## **CONCLUSIONES**

Durante la fase infantil, la capacidad esteroidogénica de los ovarios es directamente proporcional a la edad.

En los animales tratados con hormonas la respuesta ovulatoria está en función de la edad. A los 18 y 21 días de edad, pero no a los 15 días, se producen cambios en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el crecimiento folicular y la primera ovulación inducida.

A los 15 días de edad, el eje hipotálamo-hipófisis-ovario aún no alcanza la madurez, central y periférica, en los mecanismos neuroendócrinos que culminan con la ovulación. La inervación noradrenérgica periférica no estaría modulando dicho proceso a esta edad.

La inervación noradrenérgica periférica modula inhibitoriamente la acción de las gonadotropinas sobre el proceso de la ovulación, pero dicha inhibición durante la fase infantil se manifiesta a los 18 días de edad y es claramente evidente a los 21 días de edad.

## BIBLIOGRAFÍA

ADVIS, J.P., ANDREWS, W.W. Y OJEDA, S.R. (1979). Changes in ovarian steroidal and prostaglandin E responsiveness to gonadotropins during the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 104:653-658.

ADVIS, J.P., SMITH-WHITE, S. Y OJEDA, S.R. (1981). Activation of growth hormone short loop negative feedback delays puberty in the female rat. *Endocrinology* 108: 1343-1352.

AGUADO, L.I. Y OJEDA, S.R. (1984). Effect of selective removal of the adrenal medulla on female sexual development. *Biology of Reproduction* 31:605-618.

AGUADO, L.I. Y OJEDA, S.R. (1984a). Prepubertal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology* 114:1845-1853.

AGUADO, L.I. Y OJEDA, S.R. (1984b). Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* 114:1944-1946.

AGUADO, L.I., PETROVIC, S.L. Y OJEDA, S.R. (1982). Ovarian  $\beta$ -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology* 110: 1124-1132.

AHMED, C.C., DEES, W.L. Y OJEDA, S.R. (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP) containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118: 1682-1689.

ANDREWS, W.W. Y OJEDA, S.R. (1977). On the feedback actions of estrogen on gonadotropin and prolactin release in infantile female rats. *Endocrinology* 101: 1517-1523

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**ANDREWS, W.W., MIZEJEWSKI, G.J. y OJEDA, S.R. (1981).** Development of estradiol-positive feedback on luteinizing hormone release in the female rat: A quantitative study. *Endocrinology* 109: 1404-1413.

**ANGELETTI, P.U., LEVI-MONTALCINI, R. y CARAMIA, F. (1972).** Structural and ultrastructural changes in developing sympathetic ganglia induced by guanethidine. *Brain Research* 43: 515-525.

**AYALA, Ma. E. y DOMINGUEZ, R. (1988).** Ovulatory response to the sequential administration of follicles stimulating hormone and human chorionic gonadotropin by autografted ovary in unilaterally ovariectomized adult rat with peripheral denervation induced by guanethidine treatment. *La Revista de Investigación Clínica* 40: 149-155.

**BECÚ-VILLALOBOS, D. y LACAU-MENGIDO, I.M. (1990).** Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta physiology pharmacology Latinoamericana* 40: 1-17

**BLANDAU, R.J. y MONEY, W.L. (1943).** The attainment of sexual maturity in the female albino rats as determined by the copulatory response. *Anatomical Record* 86: 215.

**BOUSFIELD G. R., PERRY M.W., y WARD, D.W. (1994).** Gonadotropins Chemistry and Biosynthesis. *The physiology of reproduction*. 2a ed. Ed. Knobil E.; Neill, J.D. Raven Press, Ltd., New York. p.p. 1749-1782.

**BRAW, R.H. y TSAFRIRI, A. (1980).** Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 59: 267-272.

**BURDEN, H. W. (1978).** Ovarian innervation. En: *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. Ed. Jones, R.J.; Plenum Press, New York.; London; p.p. 615-638.

**BURDEN, H.W. (1985).** The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: Catecholamines as hormone regulators. Eds. Ben Jonathan, N., Bahr, J.M. y Weiner, R.I.; Raven Press, New York, p.p. 261-278.

**CRUZ, M.E. (1990).** Asimetría Hipotalámica en los mecanismos que regulan la función del ovario. Estudio experimental en la rata adulta. Tesis de Doctorado, Doctor en Ciencias Fisiológicas, UNAM., México.

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

**DALKIN, A.C., BOWNE, G.A., PIEPER, D.R., REGIANI, S. y MARSHALL, J.C. (1981).** Pituitary and gonadal gonadotropin-releasing hormone receptors during sexual maturation in the rat. *Endocrinology* 108: 1658-1664.

**DARNEY Jr., K.J., GOLDMAN, J.M. y VANDENBERGH, J.G. (1992).** Neuroendocrine responses to social regulation of puberty in the female house mouse. *Neuroendocrinology* 55: 434-443.

**DEES, W.L., AHMED, C.E. y OJEDA, S.R. (1986).** Substance P-and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology* 119: 638-641.

**DLUZEN, D., GUAN, X. y VANDENBERGH, J.G. (1992).** Puberty acceleration in female mice induced with a partially purified male urine extract: effects on catecholamine release from the olfactory bulbs and hypothalamus. *Brain Research* 585: 367-371.

**DÖLHER, K.D. y WUTTKE, W. (1975).** Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin, and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology* 97: 898-907

**DOMINGUEZ, R. y RIBONI, L. (1971).** Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology* 7: 164-170.

**DOMINGUEZ, R., y ZIPITRIA, D. (1980).** Longterm effects of guanethidine administration on the ovulatory response of the rat. *IRCS. Medical Science*, 8;352.

**DOMINGUEZ, R., GAITAN, C.M., QUINTANAR, J.L., MENDEZ, S.A. (1983)** Diferente respuesta de la ovulación inducida en rata prepúber, al bloqueo beta-adrenérgico antes de la administración de FSH o de la LH XXIII Reunión de la Sociedad Mexicana de Nutrición y Endocrinología. Libro de Resúmenes 71.

**DOMINGUEZ, R., ZIPITRIA, D., RIBONI, L., REVILLA, R. (1985).** Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the estrous cycle of the rat. *J. Interdisc. Cycle Res.* 16;63-72.

**DOMINGUEZ, R., CHAVEZ, R. Y CRUZ, M.E. (1991)** "La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico" En: *Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción*. Ed: R. Domínguez, UNAM-M.A. Porrúa, México, Cap 6, p.p. 137-190.

**EVANS, B. y BURNSTOCK, G. (1979).** Chronic guanethidine treatment of female rats including effects on the fetus. *Journal of Reproduction and Fertility* 56: 715-724.

**EVANS, B.K. (1979).** Influence of Neuronal Activity Levels on the Cytotoxic Effects Guanethidine. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 209: 205-214

**FINK, G. (1986).** The endocrine control of ovulation. *Sci. Prog. Oxf.* 70: 403-423.

**FLORES, A. y DOMINGUEZ, R. (1992).** Noradrenergic peripheral denervation of the female rat accelerates the positive feedback mechanisms resulting in pubertal ovulation, and blocks the modifications induced by

pubertal ovulation, and blocks the modifications induced by administration of testosterone propionate at birth. *Journal of Endocrinology* 135: 415-420.

**FLORES, A., AYALA, M.E. y DOMINGUEZ, R. (1990).** Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the puberal and the adult rat?. *Medical Science Research* 18: 817-818.

**FRANCE, E.S. (1979).** Reversal by pargyline of reserpine block of induced ovulation-direct ovarian effects. *Neuroendocrinol.* 6; 77-89.

**FUNKESTEIN, B., NIMROD, A. y LINDNER, H.R. (1980).** The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries. *Endocrinology* 106: 98-106.

**GOLDMAN, B.D. (1981).** Puberty. En: *Neuroendocrinology of Reproduction*. Ed. Adler, N.T. Plenum press, New York; London; p.p. 229-239.

**GONZALEZ, M.E. (1994).** Efectos agudos y crónicos de la sección del Nervio Ovárico Superior sobre la concentración de catecolaminas en el ovario de la rata prepúber. Tesis de Licenciatura, QFB, UNAM., México.

**GOODMAN, G., y GILMAN, G. (1991).** *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. 8a. de; Ed. Interamericana, México. 1751.

**HEATH, J.W. y BURNSTOCK, G. (1977).** Selectivity of neuronal degeneration produced by chronic guanethidine treatment. *Journal of Neurocytology* 6: 397-405.

**HIRSHFIELD, A.N. y DePAOLO, L.V. (1981).** Effect of suppression of the surge of follicles-stimulating hormone with porcine follicular fluid on follicular development in the rat. *Journal of Endocrinology* 88: 67-71.

**HIRSHFIELD, A.N. y MIDGLEY, A.R. (1978).** The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biology of Reproduction* 19: 592-605.

**JAIM-ETCHEVERRY, G. y ZIEHER, L.M. (1971).** Permanent depletion of peripheral norepinephrine in rats treated at birth with 6-hydroxydopamine. *European Journal of Pharmacology* 13: 272-276.

**JOHNSON Jr., E.M., O'BRIEN, F. y WERBITT, R. (1976).** Modification and characterization of permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats. *European Journal of pharmacology* 37: 45-54.

**LARA, H.E., McDONALD, J.K. AHMED, C.E. y OJEDA, S.R. (1990a).** Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127: 2199-2209.

**LARA, H.E., McDONALD, J.K. y OJEDA, S.R. (1990).** Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 126: 364-375.

**LAWRENCE, I.E., y BURDEN, H.W. (1980).** The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record* 196:51-59.

**LEFKOWITZ, R. J., HOFFMAN, B.B., y TAYLOR, P. (1991).** Transmisión Neurohumoral de los Sistema Nervioso Autónomo y Motor Somático En: *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Eds. Goodman, I.S. y Gilman, A. 8a ed; Panamericana; México; p. 751.

**McCOMARCK, C. E. y MEYER, R.K. (1984).** Minimal age for induction of ovulation with progesterone in rats: Evidence for neural control. *Endocrinology* 74: 793-799.

**McDONALD, J.K., DEES,W.L., AHMED,C.E., NOE, B.D. y OJEDA, S.R. (1987).** Biochemical and immunocytochemical characterization of neuropeptide Y in the immature rat ovary. *Endocrinology* 120: 1703-1710.

**MORALES, L., CHAVES, R. y DOMINGUEZ, R. (1993).** 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. *Medical Science Research* 21: 15-17.

**MORALES, L., CHAVES, R. y DOMINGUEZ, R. (1993).** La respuesta ovulatoria al estímulo gonadotrópico en hembras prepúberes depende de la integridad del Nervio Ovárico Superior. XVIII Reunión anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Libro de Resúmenes. 309-313.

**NEILSON, D., SEEGAR-JONES, G. WOODRUF, J.D. y GOLDBERG, B. (1970).** The innervation of the ovary. *Obstetrical and Gynecological Survey* 25: 889-904.

**NICKERSON, M. y COLLIER, B. (1978).** Fármacos que inhiben los nervios adrenérgicos y los órganos que estos inervan. En: *Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Eds. Goodman, L.S. y Gilman, A. 5a. ed; Interamericana; México; p.p. 447-473.

**OJEDA, S.R. y JAMESON, H.E. (1977).** Developmental patterns of plasma and pituitary growth hormone (GH) in the female rat. *Endocrinology* 100: 881-889.

**OJEDA, S.R. y URBANSKI, H.F. (1994).** Puberty in the Rat. En: *The Physiology of Reproduction*. 2a. Ed. Eds. Knobil, E. y Neill, J.D. Raven Press, Lid., New York, USA pp.363-409

**OJEDA, S.R., AGUADO, L.I. y SMITH-WHITE, S. (1983).** Neuroendocrine mechanisms controlling the onset of female puberty: The rat as a model. *Neuroendocrinology* 37: 306-313.

**OJEDA, S.R., URBANSKI, H.F. y AHMED, C.E. (1986).** The onset of female puberty: Studies in the rat. *Recent Progress in Hormone Research* 42: 385-440.

**OJEDA, S.R., URBANSKI, H.F., ROGERS, L.C., GONZALEZ, D., y FAHRENBACH, W.H. (1989).** Neuroendocrine control of female puberty:

Function. De Neurology and Neurobiology. Eds. Lakoski, J.M. Pérez-Polo, J.R. Rassin. D.K. Liss., A.R. Inc., New York, USA. pp.61-67.

**PARKER, C.R. Jr, COSTOFF, A. MULDOON, T.G. y MAHESH, V.B. (1976).** Actions of pregnant mare serum gonadotropin in the immature female rat: Correlative changes in blood steroids, gonadotropins, and cytoplasmatic estradiol receptors of the anterior pituitary and hypothalamus. *Endocrinology* 98: 129-138.

**PITZEL, L., JARRY, H. y WUTTKE, W. (1991).** Effects of Substance-P and Neuropeptide-Y on *in Vitro* Steroid Release by Porcine Granulosa and Luteal Cells. *Endocrinology* 129: 1059-1065.

**QUINN, D.L. y ZARROW, M.X. (1964).** Inhibition of pregnant mare's serum induce ovulation in the immature rat. *Endocrinology* 74: 309-313.

**QUIROZ, U. (1994).** Efectos de la deservación catecolaminérgica realizada durante la etapa fetal sobre la pubertad espontánea de la rata hembra o macho. Tesis de Licenciatura. Biólogo, UNAM., México.

**RAMALEY, J. A. (1979).** Development of gonadotropin regulation in the prepubertal mammal. *Biology of Reproduction* 20:1-31.

**RAMALEY, J.A. y PHARES, C.K. (1980).** Delay of puberty onset in females due to suppression of growth hormone. *Endocrinology* 106:1989-1993.

**RAMREZ, V.D. (1973).** Endocrinology of puberty. En *Handbook of Physiology*. American Physiological Society Vol II. Cap 1 Washington: p.p. 1-28.

**RAUM, W.J., GLASS, A.R. y SWERDLOFF, R.S. (1980).** Changes in hypothalamic catecholamine neurotransmitters and pituitary gonadotropins in the immature female rat: relationships to the gonadostat theory of puberty onset. *Endocrinology* 103: 1253-1258.

**RICHARDS, J.S. y BOGOVICH, K. (1982).** Effects of human chorionic gonadotropin and progesterone on follicular development in the immature rat. *Endocrinology* 111: 1429-1438.

**RODRIGUEZ, C. R. (1984).** *Vadémecum Académico de Medicamentos.* Tomo I; UNAM; México; p. 418.

**ROSAS, P., ARGÜELLO, M.S. y DOMINGUEZ, R. (1989).** Effects of noradrenergic peripheral denervation spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. *Medical Science Research* 17: 285-286.

**SAHU, A., PHELPS, C.P., WHITE, J.D., CROWLEY, W.R., KALRA, S.P. y HALRA, P.S. (1992).** Steroidal Regulation of Hypothalamic Neuropeptide Y-Release and Gene Expression. *Endocrinology* 130: 3331-3336.

**SASAMOTO, S. y JOHKE, T. (1975).** FSH and LH release during the first ovulation period of immature rat pretreated with PMS. *Biology of Reproduction* 13: 195-202.

**SASAMOTO, S., HARADA, S. y TAYA, K. (1977).** Selective release of follicles-stimulating hormone during the period of ovulation induced by human chorionic gonadotrophin in dioestrus rat. *Journal of Endocrinology* 75:179-180.

**SAWAMOTO, J. y SASAMOTO, S. (1973).** Follicular development after the first ovulation in immature rats pretreated with PMSG. *Endocrinología Japónica.* 20: 581-585.

**SCHWARTZ, N.B. (1974).** The role of FSH and of their antibodies on follicles growth and ovulation. *Biology of Reproduction* 10: 236-272.

**SHAND, D.G., MORGAN, D.H. y OATES, J.A. (1973).** The release of guanethidine and bethanidine by splenic nerve stimulation: a quantitative evaluation showing dissociation from adrenergic blockade. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 184: 73-80

**TAYA, K., SAWAMOTO, J. y SASAMOTO, S. (1974).** The effects of the initial age and body weight on PMS-induced ovulation in immature rats. *Japan Journal of Animal Science* 20:1-6.

**URBANISKI, H. F. y OJEDA, S.R. (1986).** The development of afternoon minisurges of luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats. is ovary dependent. *Endocrinology* 118:1187-1193

**VILLAVICENCIO, J., FLORES, A. y DOMINGUEZ, R. (1993).** Age dependence of the ovulatory response to gonadotropins in pubertal rats. *Medical Science Research.*, 21:89-71

**WELSCHEN, R. y DULLAART, J. (1974).** Serum concentrations of follicle-stimulating hormone and luteinizing hormone after unilateral ovariectomy in the adult rat. *Journal of Endocrinology* 63: 421-422.

**WELSCHEN, R. y DULLAART, J. (1976).** Administration of antiserum against ovine follicle-stimulating hormone or ovine luteinizing hormone at pro-oestrus in the rat: Effects on follicular development during the oncoming cycle. *Journal of Endocrinology* 70: 301-306.

**ZARROW, M. X. y WILSON, E.D. (1961).** The influence of age on superovulation in the immature rat and mouse. *Endocrinology* 69: 851-855

**ZARROW, M. X., BRODY, P.N. y CLARK, J.H. (1971).** Plasma progesterone levels in the pregnant mare's serum (PMS)-treated immature rats. *Fertility and Sterility.* 22: 790-793.

**ZARROW, M. X., y QUINN, D.L. (1963).** Superovulation in the immature rat following treatment with PMS alone and inhibition of PMS-induced ovulation. *Journal of Endocrinology* 26: 161-166.