

51281

2

lej



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

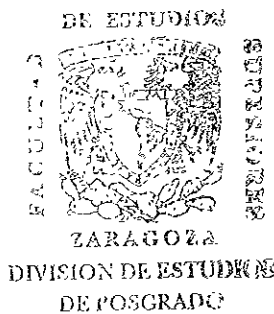
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS  
NEUROENDÓCRINOS QUE PARTICIPAN EN EL  
CONTROL DE LA PUBERTAD DE LA HEMBRA.  
LA COBAYA COMO MODELO.**

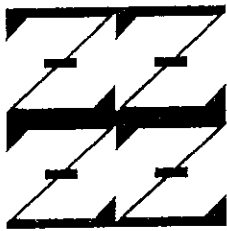
Que para obtener el título de  
**Doctor en Ciencias**  
**(Biología)**

Presenta:

*Laura Riboni Rodríguez*



U N A M  
FES  
ZARAGOZA



LO HUMANO EJE  
DE NUESTRA REFLEXION

Director de Tesis:

*Dr. Roberto Domínguez Casalá*

26/30/22

México, D.F. Junio 1998

TESIS CON

PLATA DE ORO



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**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**

**DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO**

**ESTUDIO DE LOS MECANISMOS NEUROENDÓCRINOS QUE  
PARTICIPAN EN EL CONTROL DE LA PUBERTAD DE LA  
HEMBRA. LA COBAYA COMO MODELO.**

Que para obtener el título de  
**Doctor en Ciencias**  
**(Biología)**

Presenta:

*Laura Riboni Rodríguez.*

Director de Tesis: Dr. *Roberto Domínguez Casalá*

Esta tesis fue desarrollada en la Escuela de Biología y el Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Durante la realización de este trabajo se contó con el apoyo financiero de CONACyT (proyecto 2343P-M) y del Programa de Apoyo a las Divisiones de Estudio de Posgrado de la U.N.A.M. (PADEP: proyectos 500303, 500301 y 500308).

PAGINACION

DISCONTINUA

**A GONZALO E ISMAEL**

## **Agradecimientos**

-A los integrantes del Jurado:

Dr. Manuel Salas Alvarado.  
Dr. Enrique Pedernera Astegiano.  
Dra. Patricia Rosas Saucedo.  
Dra. Leticia Morales Ledesma.  
Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán.  
Dra. Ma. Elena Ayala Escobar.  
Dr. Roberto Domínguez Casalá.

por sus acertadas críticas y sugerencias.

-Al M.V.Z. Carlos Escamilla Weinman, Director del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla y a los técnicos: Sr. Hugo E. Escamilla Abarca, Sr. José Luis Robles Arenas y Sr. Mario A. Pérez Moreno

por proporcionar y mantener a los animales utilizados en este trabajo.

-Al Dr. Roberto Chavira del I.N.N. Salvador Zubirán

por las determinaciones hormonales.

-A Gonzalo Núñez Riboni

por su apoyo en todos los aspectos de computación.

-A todos los compañeros del L-321.

# Índice

RESUMEN.....	1
SUMMARY.....	3
DEFINICIÓN.....	5
PERSPECTIVAS HISTÓRICAS.....	6
GENERALIDADES.....	7
<b>I. NIVEL HIPOTALÁMICO.....</b>	<b>11</b>
ASPECTOS MORFOLÓGICOS.....	11
MECANISMO DE REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GNRH.....	13
SISTEMAS DE NEUROTRANSMISIÓN Y REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE LA GNRH.....	14
MADURACIÓN DEL SISTEMA GNRHÉRGICO.....	19
<i>Mujer</i> .....	19
<i>Oveja</i> .....	20
<i>Rata</i> .....	20
<b>II. NIVEL HIPOFISARIO.....</b>	<b>21</b>
HUMANO.....	21
OVEJA.....	22
RATA.....	22
<b>III. NIVEL OVÁRICO.....</b>	<b>23</b>
LA INERVACIÓN DEL OVARIO.....	26
<i>Rata</i> .....	28
<i>Oveja</i> .....	29
<b>PUBERTAD EN LAS ESPECIES NO PRIMATES.....</b>	<b>30</b>
LA COBAYA COMO MODELO DE ESTUDIO.....	31
<b>PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....</b>	<b>37</b>
GUANETIDINA.....	38
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>39</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>40</b>
PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA.....	40
ANÁLISIS DE LA POBLACIÓN FOLICULAR.....	40
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	41
<b>OBJETIVO I.....</b>	<b>42</b>
RESULTADOS.....	42
<b>OBJETIVO II.....</b>	<b>46</b>
DISCUSIÓN.....	52
<b>OBJETIVO III.....</b>	<b>54</b>
RESULTADOS.....	54
<i>A- Efectos de la hemicastración derecha.....</i>	<i>54</i>
<i>B- Efectos de la hemicastración izquierda.....</i>	<i>55</i>
<i>C- Efectos de la denervación inducida por la administración de guanetidina en la cobaya con hemicastración derecha...56</i>	<i>56</i>
<i>D- Efectos de la denervación inducida por la administración de guanetidina en la cobaya con hemicastración izquierda.56</i>	<i>56</i>

<b>OBJETIVO IV</b> .....	<b>58</b>
RESULTADOS .....	58
<i>A- Efectos de la hemicastración derecha o izquierda en cobayas con autoinjerto del ovario....</i> .....	58
<i>B- Efectos de la denervación noradrenérgica periférica en cobayas con hemicastración derecha o izquierda, y autoinjerto del ovario extirpado.....</i> .....	60
DISCUSIÓN.....	66
<b>OBJETIVO V</b> .....	<b>68</b>
RESULTADOS.....	69
DISCUSIÓN .....	70
<b>OBJETIVO VI</b> .....	<b>71</b>
RESULTADOS.....	71
DISCUSIÓN.....	74
<b>DISCUSIÓN GENERAL</b> .....	<b>76</b>
<b>CONCLUSIONES</b> .....	<b>82</b>
<b>PERSPECTIVAS</b> .....	<b>85</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b> .....	<b>86</b>



## RESUMEN

Existen evidencias de que la inervación simpática del ovario participa en la regulación del desarrollo folicular y la ovulación. Con el propósito de analizar esta posibilidad en el presente trabajo se estudiaron los efectos de la denervación simpática noradrenérgica provocada por la administración de guanetidina (20 mg/K) a cobayas recién nacidas y de diez días de edad.

La denervación simpática periférica desde el nacimiento resultó en la pérdida del contenido de noradrenalina ovárica ( $0.95 \pm 0.1$  ng/mg de tejido en los animales testigo vs. no detectable en los tratados). La administración de guanetidina a cobayas recién nacidas o de diez días de edad, adelantó la primera ovulación y la edad de la primera apertura vaginal:  $27 \pm 1.2$  (recién nacidas),  $26 \pm 1.7$  (10 días de edad) vs.  $37 \pm 0.9$  (testigos). El número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios de los animales testigo y denervados fue similar ( $3.5 \pm 0.2$  vs.  $3.3 \pm 0.3$ ). El peso relativo (mg/100g) de los ovarios de los animales denervados sacrificados en la fase folicular, fue mayor que el de los testigo ( $27.8 \pm 1.3$ ;  $28.9 \pm 3.0$  vs.  $20.9 \pm 0.8$   $P < 0.05$ ) en tanto que el peso uterino fue menor ( $179 \pm 13$ ,  $149 \pm 28$  vs.  $292 \pm 20$ ). Cuando los animales fueron autopsiados en la fase luteal, el peso relativo de los ovarios de los animales denervados fue mayor que el de los controles ( $21.4 \pm 1.7$  vs.  $16.8 \pm 1.4$ ,  $P < 0.05$ ). El número promedio de folículos contados en los ovarios de los animales denervados fue significativamente mayor que el de los controles ( $1736 \pm 230$  vs.  $969 \pm 147$ ,  $P < 0.05$ ). El diámetro promedio de los folículos del ovario de las cobayas testigo autopsiadas en la fase folicular, fue significativamente mayor que el de los animales sacrificados en la fase luteal ( $263 \pm 3.9 \mu\text{m}$  vs.  $248 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.01$ ). El diámetro promedio de los folículos medidos en los ovarios de los animales denervados fue significativamente mayor que en los testigos (tratadas al nacimiento:  $274 \pm 2.0 \mu\text{m}$  vs.  $255 \pm 2.4 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.05$ ; tratadas desde el día 10:  $286 \pm 2.3 \mu\text{m}$  vs.  $257 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.05$ ). Cuando se analizó el diámetro folicular promedio del ovario derecho e izquierdo de los animales testigo, el diámetro folicular del ovario izquierdo fue significativamente mayor que el del ovario derecho ( $309 \pm 6.0 \mu\text{m}$  vs.  $214 \pm 3.9 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.01$ ). La respuesta del ovario derecho y del izquierdo a la denervación simpática fue diferente: en el ovario izquierdo el diámetro folicular fue menor que en los testigos, en tanto que en el ovario derecho el diámetro siempre fue mayor.

Para analizar si la participación de la inervación periférica en los mecanismos que regulan la función del ovario pueden ser lateralizados se hemicastraron cobayas del ovario derecho o del izquierdo. Veintiuno de estos animales fueron denervados con guanetidina..

Los testigos absolutos sacrificados en la fase folicular no ovularon. Los sacrificados en la fase luteal tuvieron  $1.8 \pm 0.5$  (ovario derecho) y  $1.5 \pm 0.3$  (ovario izquierdo). La hemicastración tanto derecha como izquierda, adelantó la primera ovulación. El número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios de los animales hemicastrados, autopsiados en la fase folicular fue similar para ambos ovarios:  $2.5 \pm 0.4$  (ovario derecho "*in situ*") y  $2.4 \pm 0.4$  (ovario izquierdo "*in situ*"). El porcentaje de animales ovulantes fue significativamente mayor cuando el ovario extirpado fue el derecho: 40% (ovario derecho "*in situ*") y 100% (ovario izquierdo "*in situ*"). ( $P < 0.01$ ). El porcentaje de HCO para los animales autopsiados en la fase folicular fue de  $41.5\% \pm 5.2$  (ovario izquierdo) vs.

28.5%±1.5 (ovario derecho).y para los animales sacrificados en la fase luteal: 45.9%±7.2 (ovario izquierdo) vs 43.4% ±12.9 (ovario derecho).

En los grupos de animales hemicastrados y denervados la edad de la primera apertura vaginal sólo se adelantó en el grupo con el ovario derecho "*in situ*".

Los grupos de animales hemicastrados con autoinjerto del ovario extirpado tuvieron un adelanto de la apertura vaginal: 32 ±0.8 (ovario izquierdo "*in situ*") y 32±0.9 (ovario derecho "*in situ*") (P<0.02 vs. hemicastradas). El número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios de estos grupos, autopsiados en la fase folicular fue de 2.6±0.2 (ovario derecho "*in situ*") y 3.0±0.4 (ovario izquierdo "*in situ*"). El porcentaje de animales ovulantes fue similar para los dos grupos: 83% (ovario derecho "*in situ*") y 80% (ovario izquierdo "*in situ*"). La presencia del autoinjerto modificó el porcentaje de HCO sólo en los animales con ovario derecho "*in situ*" (P<0.02 vs. hemicastradas.) La denervación con guanetidina en los animales hemicastrados y con autoinjerto del ovario extirpado adelantó la edad de la primera apertura vaginal: 32±1 ( ovario izquierdo "*in situ*") y 32±2 (ovario derecho "*in situ*") (P<0.01 vs hemicastradas). Los animales hemicastrados, autoinjertados y denervados sólo presentaron cuerpos lúteos cuando fueron sacrificados en la fase luteal.

Todos los grupos de animales sacrificados en la fase luteal presentaron ovulación compensadora.

Para analizar si la inervación simpática del ovario modula los efectos de las gonadotropinas sobre la capacidad ovulatoria en la cobaya, se administraron PMSG-hCG a cobayas prepúberes denervadas o no con guanetidina.

La administración secuenciada de PMSG (10u.i.) a cobayas de diez días de edad, adelantó la primera apertura vaginal (22±2.3 vs 37±0.9 días, P<0.05). Este tratamiento realizado en cobayas denervadas con guanetidina desde el nacimiento, provocó un adelanto mayor de la edad de apertura vaginal (17±0.8 vs. 22±2.3 días, solamente denervadas, P<0.05).

Los resultados de este trabajo indican que en la cobaya prepúber la inervación simpática del ovario participa en la regulación del crecimiento y maduración folicular. Estos mecanismos regulatorios presentan asimetría entre el ovario derecho y el izquierdo, por lo cual es posible que la información neural que llega o sale del ovario sea diferente dependiendo del lado considerado.

## SUMMARY

There is evidence that the sympathetic innervation on the ovary plays a role in regulating ovulation. In this work we analyzed the effects of guanethidine administration (20 mg/Kg) to newborn and 10-day-old female guinea pigs on puberty, ovulation and follicular population. Peripheral denervation beginning at birth resulted in the loss of ovarian norepinephrine content ( $0.95 \pm 0.1$  ng/mg wet tissue in untreated control animals vs. Non detectable in treated animals.). Guanethidine administration to newborn or 10-day-old guinea pigs advanced puberty: age of vaginal opening  $27 \pm 1.2$  days (newborn),  $26 \pm 1.7$  (10-day-old) vs  $37 \pm 0.7$  (control),  $P < 0.001$  and ovulation. The number of corpora lutea in control and denervated animals was similar ( $3.5 \pm 0.2$  vs.  $3.3 \pm 0.3$ ). The relative weight (mg/100 gr body weight) of the ovaries and adrenals in the denervated animals autopsied during the follicular phase increased (ovaries  $27.8 \pm 1.3$ ,  $28.9 \pm 3.0$  vs  $20.9 \pm 0.8$ ,  $P < 0.05$ ; adrenals:  $36.4 \pm 1.4$ ,  $37.0 \pm 0.8$  vs.  $31.6 \pm 1.5$ ,  $P < 0.05$ ), while uterine weight diminished ( $179 \pm 13$ ,  $149 \pm 28$  vs.  $292 \pm 20$ ). When the animals were killed during the luteal phase, the relative weight of the ovaries of newborn guanethidine-treated animals was higher than that of the control animals ( $21.4 \pm 1.7$  vs  $16.8 \pm 1.4$ ,  $P < 0.05$ ). The mean number of follicles counted in the ovaries of denervated animals was significantly higher than in control animals ( $1736 \pm 230$  vs.  $969 \pm 147$ ,  $P < 0.05$ ). The mean diameter of the follicles in the untouched control ovaries in animals killed in the follicular phase was significantly larger than from animals killed in the luteal phase ( $263 \pm 3.9$   $\mu\text{m}$  vs.  $248 \pm 3.0$   $\mu\text{m}$ ,  $P < 0.01$ ). The mean diameter of the follicles measured in the ovaries of denervated animals was significantly higher than in controls (animals treated at birth:  $274 \pm 2.0$   $\mu\text{m}$  vs.  $255 \pm 2.4$   $\mu\text{m}$ ,  $P < 0.05$ ; animals treated from day 10:  $286 \pm 2.3$   $\mu\text{m}$  vs.  $257 \pm 2.3$   $\mu\text{m}$ ,  $P < 0.05$ ). When the mean diameter of the follicles in the left and right ovary of the untouched control was analyzed, the follicular diameter in the left ovary was significantly larger, than in the right ovary ( $309 \pm 6.0$   $\mu\text{m}$  vs.  $214 \pm 3.9$   $\mu\text{m}$ ,  $P < 0.01$ ). The response of the left and right ovary to sympathetic denervation was the opposite: in the left ovary the follicular diameter was smaller and in the right ovary it was larger than in controls.

To test the idea on the existence of peripheral asymmetry in the sympathetic ovarian innervation in regulatory ovarian function, we hemigonadectomized prepubertal female guinea pigs. Twenty one of the animals were administered with guanethidine. The untouched controls killed in the follicular phase did not ovulate, but when the animals were sacrificed during the luteal phase, the number of corpora lutea was  $1.8 \pm 0.5$  (right ovary) and  $1.5 \pm 0.3$  (left ovary). Hemiovariectomy advanced the age of vaginal opening and ovulation, but the number of corpora lutea in the ovaries was similar:  $2.5 \pm 0.4$  (right ovary "in situ") and  $2.4 \pm 0.4$  (left ovary "in situ"). When the right ovary was "in situ", the number of ovulating animals was 40% and 100% when the left ovary was "in situ",  $P < 0.01$ ). The percent of ovarian compensatory

hypertrophy (COH) when the animals were sacrificed in the follicular phase was  $42.5 \pm 5.2$  % (left ovary) vs.  $28.5 \pm 1.5$  % (right ovary). When the autopsy was performed in the luteal phase the OCH was:  $45.9 \pm 7.2$ % (left ovary) vs.  $43.4 \pm 12.9$ % (right ovary).

In the hemiovariectomised and denervated animals, the vaginal opening was advanced only in the group with the right ovary "in situ".

The vaginal opening was advanced in the groups of hemigonadectomised plus autograft of the extirpated ovary:  $32 \pm 0.8$  days (left ovary "in situ") and  $32 \pm 0.9$  days (right ovary "in situ"). ( $P < 0.02$  vs. Hemispayed group). The number of corpora lutea founded in the ovaries of the animals killed in the follicular phase was  $2.6 \pm 0.2$  (right ovary "in situ") and  $3.0 \pm 0.4$  (left ovary "in situ"). The number of ovulating animals was similar: 83% (right ovary "in situ") and 80% (left ovary "in situ"). The autografted ovary modified the OCH only when the right ovary was "in situ" ( $P < 0.02$ ).

The administration of guanethidine to the hemispayed, autografted animals advanced the age of vaginal opening:  $32 \pm 1$  days (left ovary "in situ") and  $32 \pm 2$  days (right ovary "in situ") ( $P < 0.01$  vs. Hemigonadectomised). Only the animals killed in the luteal phase showed corpora lutea in their ovaries and compensatory ovulation.

To analyse if the ovarian innervation participates in the control of the ovarian sensibility to gonadotropins, we injected PMSG (10 i.u.) and hCG (10 i.u.) to prepubertal female guinea pigs, with or without sympathetic denervation by guanethidine administration. The age of vaginal opening was advanced in the gonadotropin treated group:  $22 \pm 2.3$  days vs.  $37 \pm 0.9$  days in the controls ( $P < 0.05$ ). The animals denervated from birth and treated with gonadotropins presented the vaginal opening earlier:  $17 \pm 0.8$  days vs.  $22 \pm 2.3$  days (guanethidine treated animals).

Our results indicate that in the prepubertal female guinea pig, the noradrenergic ovarian innervation regulates the follicular development and the ovulation in an inhibitory way. The ovarian response to denervation seems to be different for the left and right ovary.

## DEFINICIÓN

Los diferentes intentos de los científicos para definir la pubertad han llevado a discusiones y en la actualidad no existe una definición aceptada por todos. Según Ramírez (149) la pubertad es "la etapa que enlaza a la inmadurez con la madurez sexual o la infancia con la edad adulta". Grumbach y Kaplan (85) refiriéndose a la especie humana, la consideran "la etapa de transición entre el estado juvenil y la edad adulta, durante el cual aparecen las características sexuales secundarias, se obtiene la fertilidad, se produce el crecimiento corporal de la adolescencia y tienen lugar profundos cambios psicológicos". Para Winter y Faiman (193) "es un proceso discontinuo que presenta un rápido desarrollo durante la etapa fetal y otro en la adolescencia, con una etapa silenciosa en medio que dura aproximadamente diez años".

Gorski (77) la define como "la culminación de procesos del desarrollo que ocurren durante un periodo de tiempo prolongado, incluyendo la diferenciación sexual del cerebro". Con base en las definiciones propuestas por los diferentes autores, podemos decir que la pubertad se inicia durante la etapa embrionaria con el comienzo de la diferenciación sexual y del sistema hipotálamo-hipófisis-gónada, hasta alcanzar la maduración sexual y la fertilidad completas. La capacidad de procreación culmina este proceso, lo que implica la propagación y perpetuación de la especie.

Independientemente de la definición considerada, el estudio de los mecanismos que regulan la pubertad es un tema de gran importancia en la endocrinología.

Muchos de los estudios se han realizado en la especie humana, con el fin de establecer tratamientos a las alteraciones de la maduración sexual. Otro factor importante en el desarrollo del conocimiento de esta área ha sido la posibilidad de modificar el inicio de la pubertad en otras especies animales, adelantándola en las productoras de alimento y fibras, o retrasándola en las consideradas como plagas (71).

## *Perspectivas históricas*

La participación de las gónadas en el proceso de la pubertad se conoce desde mucho antes de la era cristiana, por los efectos de la castración realizada en el hombre.

A principios de este siglo, Foà (64) mostró que el ovario proveniente de un animal inmaduro al ser injertado a una hembra adulta castrada, presentaba desarrollo folicular y ovulación. Con base en estos resultados sugirió que el proceso de maduración del ovario se alcanzaba mucho antes de la pubertad. La confirmación de estos resultados por otros investigadores, llevó a Lipschutz y cols (114) a formular la "ley de la pubertad", en la cual establecen que el inicio de los cambios puberales de la gónada están determinados por la maduración de componentes somáticos, más que por la gónada en sí. Previamente, Crowe y cols (36) habían sugerido que el componente somático que controlaba la pubertad podría ser la hipófisis, ya que la hipofisectomía parcial en perros prepuberales evitaba el inicio de la maduración sexual. En 1927 Smith y Engel (172), mostraron que el injerto de fragmentos de hipófisis en ratas y ratones inmaduros llevaba a la maduración sexual prematura. Harris y Jacobson (87) mostraron que el trasplante de hipófisis de ratas inmaduras en la eminencia media de hembras maduras previamente hipofisectomizadas, resulta en la reanudación de los ciclos estrales mucho antes de la edad correspondiente a la pubertad de las donadoras. Este resultado apoyó el punto de vista aceptado actualmente de que en la mayoría de los mamíferos, la inmadurez intrínseca de la hipófisis no es la responsable del silencio gonadal observado durante la etapa prepuberal.

Más recientemente, Plant y cols (145) mostraron que la estimulación neuroquímica intermitente del hipotálamo de monas prepúberes por tiempos prolongados, establece un modelo de actividad secretoria del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal semejante al del animal adulto. Por ello postulan que las neuronas secretoras de la hormona de liberación de las gonadotropinas (GnRH) responsables del control del sistema hipotálamo-hipofiso-gonadal, tampoco constituye el factor limitante en el desarrollo del proceso puberal. Consideran que el silencio postnatal que transcurre desde la infancia hasta la pubertad depende, al menos parcialmente, de algún mecanismo neural central capaz de modular la secreción de la GnRH por el hipotálamo.

La participación del sistema nervioso central (SNC) en la regulación del proceso puberal de los primates superiores es apoyada por un conjunto de evidencias que señala la relación entre lesiones hipotalámicas y de áreas adyacentes, con la pubertad precoz en el niño (163, 189).

## GENERALIDADES

Durante la pubertad se producen una serie de modificaciones en las funciones de la mayoría de las glándulas endocrinas cuyas hormonas estimulan la diferenciación de las características fenotípicas del individuo, en este caso los caracteres sexuales secundarios. Estos pueden observarse fácilmente en la especie humana: incremento rápido del crecimiento corporal, telarquia, pubarquia y menarca en la mujer. En algunos primates se presenta desarrollo de la "piel sexual"; en la rata el cambio de color y la canalización vaginal que acompaña a la ruptura de la membrana vaginal; en la cobaya la ruptura de la membrana vaginal.

Las modificaciones fenotípicas características de la pubertad se alcanzan a muy diferentes edades: 35 días en el ratón, 45 a 60 días en la rata, 45 a 90 días en la cobaya y hasta diez a doce años en el humano (149). Aunque no existe una relación entre el tiempo de gestación, la longitud del ciclo estral y el inicio de la pubertad, las especies que se localizan en la parte más inferior de la escala alimenticia, alcanzan esta etapa de la vida en un tiempo menor que aquellas que tienen menor número de depredadores (Tabla 1).

Tabla 1. Factores biológicos fundamentales en la vida de algunos mamíferos

Espece	Días de gestación	Edad de la pubertad (meses)	Longitud del ciclo estrol (días)
<b>Primates</b>			
Mujer	280	12-13 años	28
Chimpancé	238	8 años	35
Macaco	168	3-4 años	28
<b>Animales de granja</b>			
Yegua	336	12-15	19-23
Vaca	280	8-12	21
Cabra	151	4-8	20-21
Oveja	150	5-7	16
Cerda	112	4-7	21
<b>Animales domésticos</b>			
Perra	60	8-24	60
Gata	63	7-12	14-18
<b>Animales de laboratorio</b>			
Criceto	16	1	4
Ratón	20	1-2	4-6
Rata	21	1-3	4-5
Coneja	30	5-6	Estro continuo
Hurón	42	1-3	Estro continuo
Cobaya	64	2-3	16-18

(Modificado de Ramírez, 1973).

Además de los factores genéticos, fundamentales en la determinación de la edad de inicio de la pubertad, ésta también es influida por factores externos como el fotoperíodo, la nutrición y los estímulos socio-ambientales. Todos ellos tienen como vía final común la modulación de la actividad del eje hipotálamo-hipofiso-gonadal.

A mitad del desarrollo fetal de los primates humano y subhumano, la oveja y la cobaya, el sistema reproductor está completo desde el punto de vista estructural y con una sorprendente maduración funcional. Aunque en estas cuatro especies la unidad hipotálamo-hipofisaria fetal es independiente de la materna (85) está influenciada por secreciones hormonales placentarias de tipo esteroideo y la gonadotropina de origen coriónico, las cuales parecen suprimir la producción de las gonadotropinas fetales al inhibir la esteroidogénesis gonadal.



En el humano, estas hormonas son rápidamente eliminadas de la circulación y el recién nacido responde con un incremento brusco en la concentración sérica de las gonadotropinas hipofisarias y de los esteroides gonadales (194). La magnitud de este incremento es mayor en las niñas que en los varones y es más importante en los niños con disgenesia gonadal (175). Esto parece indicar que durante la etapa neonatal el efecto de retrocontrol negativo de los esteroides sexuales es el mecanismo fundamental en la regulación de la secreción de las gonadotropinas. En este momento, la función hipofisaria es similar a la de la pubertad temprana: la secreción de gonadotropinas es pulsátil y puede ser estimulada por la administración de la GnRH (46). Después de esta etapa rápidamente los valores plasmáticos de las gonadotropinas caen a las concentraciones bajas características de la niñez. Esta disminución en la secreción de las gonadotropinas es el resultado de un aumento en la sensibilidad hipotalámica al mecanismo de retrocontrol inhibitorio de los esteroides sexuales, cuya concentración en esta etapa es muy baja.

Aún durante la niñez existe cierta actividad gonadal: las niñas presentan ciclos intermitentes de maduración folicular y los varones bajos valores de actividad de las células de Leydig, con una relación de testosterona sérica de cuatro a uno entre la vena espermática y una vena periférica (163, 193) Sin embargo, aunque el mecanismo de retrocontrol negativo de los esteroides gonadales es operativo durante la niñez, las concentraciones de gonadotropinas durante la infancia tardía caen de manera similar en los niños agonadales y en los normales (194). Esto parece indicar que en la especie humana existe algún otro mecanismo inhibitorio sobre la secreción de gonadotropinas diferente a los esteroides sexuales.

Existe evidencia de que el determinante fundamental en la década de inmadurez sexual que llamamos infancia, es un inhibidor central de la secreción pulsátil de la GnRH. Esto se basa en la aparición de pubertad precoz en niños con trastornos del SNC, los cuales muestran que tanto la hipófisis como las gónadas del niño son capaces de realizar una función adulta completa, siempre y cuando se estimule de manera apropiada la secreción de la GnRH (193). En el humano, la pubertad se produce como resultado de la maduración hipotalámica y de un incremento gradual en la secreción pulsátil de la GnRH (84) Al principio, este fenómeno es más evidente durante el sueño, causando pulsos secretorios nocturnos de la hormona estimulante del folículo (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), los cuales son característicos de la etapa temprana de la pubertad (20). Esta señal hipotalámica pulsátil es ampliada por la hipófisis y por las gónadas y finalmente es expresada como un aumento en las concentraciones medias de gonadotropinas y esteroides sexuales en el suero. La combinación de FSH y LH secretadas por la hipófisis parece ser regulada por cambios en la frecuencia de la señal pulsátil de GnRH y por las concentraciones en el plasma de estrógenos, andrógenos y progestágenos (85).

En el mono rhesus, el modelo de secreción de las gonadotropinas durante la maduración es similar a la del humano. En esta especie, el eje hipotálamo-hipófisis-gónada también se desarrolla durante la vida fetal. Inicialmente, la secreción de gonadotropinas no presenta ningún tipo de restricciones, pero gradualmente se desarrolla el mecanismo de retrocontrol negativo esteroideo, primero dependiente de andrógenos y luego de estrógenos (192).

En el macho, la castración fetal induce un aumento en la concentración plasmática de gonadotropinas, lo que no ocurre en la hembra. Sin embargo, estos animales agonadales, al igual que el humano, presentan una caída en la concentración plasmática de gonadotropinas a la misma edad que los animales normales y el aumento en las concentraciones séricas de FSH y de LH se produce aproximadamente a la misma edad en los castrados que en los normales. Estos datos parecen señalar que en el mono rhesus juvenil, como en la especie humana, la secreción de gonadotropinas es inhibida por un mecanismo no gonadal que suprime la secreción pulsátil de GnRH.

Estudios de Knobil y cols (104) en el mono, mostraron que el componente central que regula el inicio de la pubertad se encuentra ubicado en el núcleo arcuato del hipotálamo, el cual genera una señal horaria que induce un aumento brusco en la concentración plasmática de GnRH en la circulación porta hipotalámica-hipofisaria ("pico" de GnRH). Pequeñas alteraciones en la frecuencia de esta señal pueden eliminar la secreción de las gonadotropinas o modificar la relación de la concentración plasmática de FSH y LH.

La gónada responde al aumento de las gonadotropinas con un incremento en la producción de esteroides sexuales. A mitad de la pubertad de la hembra, la concentración de estradiol en el plasma es lo bastante alta como para interrumpir la influencia inhibitoria del esteroide y provocar la primera descarga preovulatoria de gonadotropinas (58). El estradiol parece ejercer estos efectos, tanto inhibitorios como estimulantes, directamente sobre la hipófisis (189), en tanto que la progesterona parece actuar sobre el SNC (59), alterando la frecuencia de la secreción pulsátil de la GnRH (66, 76). La desconexión completa del hipotálamo medio basal realizada en la mona a los dos años de edad, no interfiere con la maduración de este sistema y la pubertad se produce de manera normal (104, 108). Pero esta desconexión o lesiones del hipotálamo posterior realizadas a una edad más temprana, resultan en una pubertad precoz (132). Por lo tanto, aunque el hipotálamo y la hipófisis constituyen una unidad que mantiene la secreción de las gonadotropinas en un modelo similar al adulto, la operatividad de esta unidad puede ser inhibida antes de la pubertad por la entrada de estímulos provenientes de otras zonas del SNC.

En la mona como en la mujer, la pubertad no lleva de manera inmediata a la fertilidad completa, ya que los primeros ciclos son anovulatorios y los siguientes presentan fases luteales muy cortas o inadecuadas (66, 68)

Para su estudio los mecanismos que regulan la pubertad pueden ser divididos en tres niveles: hipotalámico, hipofisario y ovárico.

## **I. Nivel hipotalámico**

### ***Aspectos morfológicos***

Las neuronas secretoras de la GnRH (GnRHérgicas) constituyen la vía final común por medio de la cual el SNC controla la secreción de las gonadotropinas y por ello la pubertad. La GnRH es sintetizada por neuronas peptidérgicas que la descargan en sus terminales axónicas, localizadas en la eminencia media, hacia la circulación porta hipotálamo-hipofisaria y por esta vía alcanzar a la adenohipófisis (17).

Las neuronas productoras de la GnRH se originan en la placoda olfatoria (196) desde donde migran y se ubican de manera preponderante en áreas rostrales del diencéfalo (órgano vasuloso de la lámina terminal); hipotálamo anterior (área preóptica anterior-hipotalámica anterior) e hipotálamo (núcleos ventromedial y arcuato). La distribución relativa de las poblaciones más importantes de neuronas GnRHérgicas en estas estructuras varía en las diferentes especies (170). En el mono rhesus adulto se puede distinguir dos poblaciones de neuronas GnRHérgicas. El grupo mayor proyecta los axones casi exclusivamente al sistema vascular de la eminencia media. El grupo más pequeño envía proyecciones ascendentes hacia el telencéfalo y el cerebro medio, particularmente a la sustancia gris periventricular, el hipocampo y la amígdala y tiene contactos sinápticos axosomáticos con el área preóptica anterior (Figura 1).

Para su estudio los mecanismos que regulan la pubertad pueden ser divididos en tres niveles: hipotalámico, hipofisario y ovárico.

## I. Nivel hipotalámico

### ***Aspectos morfológicos***

Las neuronas secretoras de la GnRH (GnRHérgicas) constituyen la vía final común por medio de la cual el SNC controla la secreción de las gonadotropinas y por ello la pubertad. La GnRH es sintetizada por neuronas peptidérgicas que la descargan en sus terminales axónicas, localizadas en la eminencia media, hacia la circulación porta hipotálamo-hipofisaria y por esta vía alcanzar a la adenohipófisis (17).

Las neuronas productoras de la GnRH se originan en la placoda olfatoria (196) desde donde migran y se ubican de manera preponderante en áreas rostrales del diencefalo (órgano vasuloso de la lámina terminal); hipotálamo anterior (área preóptica anterior-hipotalámica anterior) e hipotálamo (núcleos ventromedial y arcuato). La distribución relativa de las poblaciones más importantes de neuronas GnRHérgicas en estas estructuras varía en las diferentes especies (170). En el mono rhesus adulto se puede distinguir dos poblaciones de neuronas GnRHérgicas. El grupo mayor proyecta los axones casi exclusivamente al sistema vascular de la eminencia media. El grupo más pequeño envía proyecciones ascendentes hacia el telencéfalo y el cerebro medio, particularmente a la sustancia gris periventricular, el hipocampo y la amígdala y tiene contactos sinápticos axosomáticos con el área preóptica anterior (Figura 1).

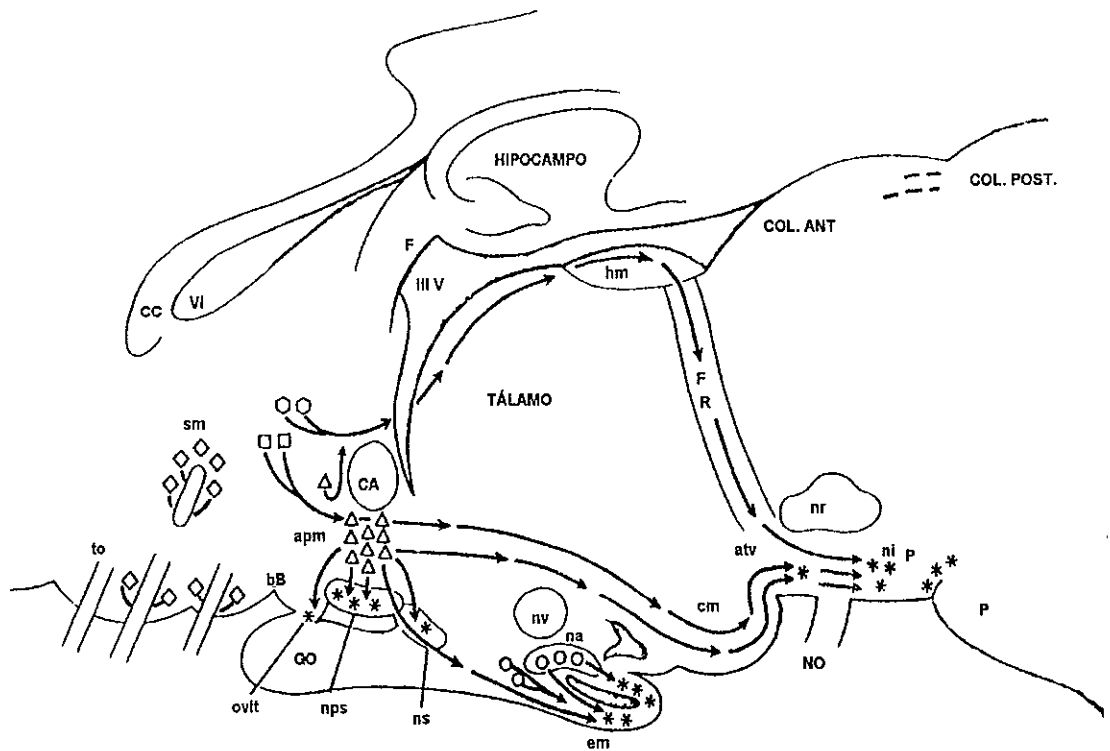


Figura 1. Esquema correspondiente al plano sagital medio de cerebro de cobayo desde el septum (parte rostral) al puente (parte posterior). Las diferentes células GnRHérgicas están representadas por diferentes símbolos geométricos, las vías nerviosas por asteriscos. CA: comisura anterior; na: núcleo arcuato; CC: cuerpo calloso; bd: banda diagonal de Broca; F: fórnix; RF: fascículo retroreflejo; nip: núcleo interpeduncular; VL: ventrículo lateral; cm: cuerpo mamilar; em: eminencia media; hm: habénula medial; apm: área preóptica media; sm: septo medial; QO: quiasma óptico; to: tubérculo olfatorio; ovt: órgano vasculoso de la lámina terminal; nps: núcleo preóptico-supraquiasmático; nr: núcleo rojo; ns: núcleo supraquiasmático; nv: núcleo ventromediano; avt: área ventral tegmental; III V: tercer ventrículo; NO: núcleo óculomotor. Tomado de Silverman AJ. 1988.

Las neuronas GnRHérgicas son morfológicamente heterogéneas. En la mayoría de las especies tienen forma oval o fusiforme, con un diámetro máximo de 10-20  $\mu\text{m}$ . Las dendritas, no ramificadas, se extienden desde uno o ambos extremos de la célula, en tanto que el axón se origina en una dendrita o en el soma. En la rata se describió una segunda población neuronal con procesos espinosos que hacen pensar en que en estas neuronas se produce la recepción de un mayor número de aferencias (11, 167). En la oveja (111) y el mono rhesus (167, 170, 170) se encontraron células de mayor tamaño con respecto a las otras especies y con arborizaciones dendríticas ramificadas y complejas.

El núcleo está ubicado centralmente y contiene uno o dos nucleólos de gran tamaño. El citoplasma presenta varias cisternas de retículo endoplasmático rugoso, uno o más complejos de Golgi y gránulos secretorios de 40-130  $\mu\text{m}$  de diámetro. Silverman y cols (171) en reconstrucciones seriadas de cortes ultrafinos, mostraron interacciones sinápticas entre las neuronas GnRHérgicas y la presencia de puentes citoplasmáticos entre ellas. Por técnicas de inmunohistoquímica de doble marcaje, describieron sinapsis aferentes a las células GnRHérgicas, que contienen diferentes tipos de neurotransmisores: noradrenalina

(NA), dopamina (DA), serotonina (SER), ácido amino-gamma-butírico (GABA),  $\beta$ -endorfina ( $\beta$ E) y factor liberador de córticotrofina (CRF).

A partir de estudios realizados en la rata, algunos autores consideran que la morfología de las neuronas GnRHérgicas cambia durante el desarrollo y que este hecho es importante en la coordinación de la actividad neuronal que resulta en el modelo puberal de la secreción de las gonadotropinas.

### ***Mecanismo de regulación de la secreción de la GnRH***

Las neuronas que secretan la GnRH lo hacen con un modelo sincronizado y fásico con aumentos bruscos de secreción ("picos"), cuya frecuencia depende de la especie en estudio. A este modelo de secreción Knobil (103) lo denominó "generador de pulso GnRH".

En todas las especies de mamíferos estudiadas, la secreción de GnRH en el animal adulto es de tipo "pulsátil" (103). Este modelo de descarga de la GnRH parece estar ya establecido en el periodo prepuberal, aunque en general la cantidad secretada es baja (103). Durante el desarrollo fetal el número de neuronas GnRHérgicas parece ser insuficiente para mantener este modelo de descarga del péptido o bien sus conexiones no están completamente establecidas. A medida que avanza el desarrollo, se plantea la existencia de un mecanismo de inhibición sobre un sistema neuronal ya totalmente desarrollado.

Al inicio de la etapa prepuberal en la que comienza la secreción pulsátil de la GnRH, los pulsos no son sincrónicos lo cual podría ser consecuencia de una actividad aun desorganizada de las neuronas secretoras. En la rata, estas neuronas comienzan a sincronizar su secreción en la etapa juvenil tardía (138) lo que permite suponer que en ese momento se establecieron completamente los contactos sinápticos de vías aferentes, o bien que se establecieron interrelaciones funcionales entre las propias neuronas GnRHérgicas (136, 138).



Los más importantes son:

1- Noradrenalina (NA). La inervación noradrenérgica aferente al hipotálamo proviene de neuronas cuyos somas están ubicados en diferentes núcleos: A1 en la porción ventromedial de la protuberancia, A2 en el núcleo caudal del tracto solitario, A3-A5 en la región ventromedial del puente, A6 en el locus ceruleus y A7 en la formación reticulada mesencefálica.

Los axones provenientes de estas neuronas llegan al hipotálamo por dos vías: el haz ventral, que contiene fibras de todos estos núcleos y que inerva al núcleo paraventricular (A1, A2 y A6) el área preóptica (A1 y A2) y el haz noradrenérgico dorsal formado por fibras provenientes de A6 y que inerva a los núcleos hipotalámicos dorsales. Todas estas fibras terminan cerca de las neuronas GnRHérgicas, pero sin establecer conexiones sinápticas con ellas.(105)

En la rata, la administración de bloqueadores de la síntesis de NA, de bloqueadores específicos de receptores  $\alpha_1$  adrenérgicos, de la neurotoxina 6-hidroxidopamina, así como la sección quirúrgica del haz noradrenérgico ventral, eliminan el "pico" ovulatorio de la LH. Este efecto no se observa en el animal castrado. En ratas normales, y solamente en la tarde del proestro se encontró un aumento de la liberación de NA en el área preóptica medial, en los núcleos arcuato y supraquiasmático y en el eminencia media el cual coincide con el pico ovulatorio de la LH (8, 97, 131, 162).

2-Adrenalina (A). Se identificaron tres grupos de neuronas adrenérgicas: C1, en la protuberancia ventrolateral rostral, C2 en la porción rostromedial del tracto del fascículo solitario y C3 en la protuberancia rostromedial. Las mayores concentraciones de A se observan en los núcleos hipotalámicos dorsomedial, paraventricular, periventricular, arcuato y supraóptico (86). El bloqueo de la síntesis de A parece inhibir el aumento de LH provocado por la administración secuenciada de estradiol y de progesterona. Los efectos de NA y A parecen ser mediados por receptores de tipo  $\alpha$  y  $\beta$  adrenérgicos. Los datos obtenidos en la rata, parecen apoyar la hipótesis de que ambas catecolaminas participan en la regulación del aumento preovulatorio en la concentración plasmática de la LH, y que este efecto es mediado fundamentalmente por receptores del tipo  $\alpha_1$  cuya mayor concentración se encuentra en el área preóptica (105) .

3- Dopamina (DA). Los somas de las neuronas dopaminérgicas están ubicados en las zonas A11 y A13 (tálamo caudal, área hipotalámica posterior), A12 (túberoinfundibular) y A14 (núcleo periventricular hipotalámico). Los axones del grupo A12 llegan al sistema porta-hipotalámico en la eminencia media y los de A14 se proyectan hacia el núcleo preóptico. En el hipotálamo de la rata se describieron contactos sinápticos entre las neuronas dopaminérgicas y las GnRHérgicas (105).



En la rata adulta, la administración de antagonistas de la DA en la mañana del proestro reduce la magnitud del "pico" de LH en la tarde de ese mismo día. La administración intraventricular de DA o de su antagonista apomorfina, estimula la secreción de LH en ratas castradas y tratadas con estrógenos. Este efecto estimulante parece depender de la especie y los tipos de agonistas o antagonistas utilizados (130).

4- Serotonina (5-HT). Los somas de las neuronas serotoninérgicas se encuentran localizadas, en su mayoría, en el núcleo del rafe medio del tallo cerebral localizado en el mesencéfalo y que se divide en núcleo dorsal, medial y del puente. Los axones provenientes de los núcleos dorsal y medio del rafe llegan al hipotálamo por dos haces: rafe-arcuato dorsal y rafe-periventricular dorsal. El núcleo arcuato es el más densamente innervado. Las terminales serotoninérgicas hacen sinapsis con neuronas GnRHérgicas en el área preóptica media (105).

Los efectos de la 5-HT sobre la secreción de la GnRH, parecen depender de las concentraciones de hormonas esteroideas: la administración intraventricular de 5-hidroxi-triptamina (5HT) a la rata hembra castrada inhibe la liberación de LH, la estimula en el macho normal y no tiene efecto en hembras intactas. Cramer y Barraclough (33) mostraron un aumento de 5-HT en el núcleo supraquiasmático y en la eminencia media, el cual coincide con el "pico" ovulatorio de la LH. Este aumento no se observa en la rata macho ni en la hembra castrada. La administración secuenciada de estradiol y progesterona produce un aumento significativo de 5-HT en los núcleos del rafe dorsal, hipotálamo preóptico anterior y eminencia media (105).

5- Acido amino-gamma-butírico (GABA). Los somas de las neuronas gabaérgicas se encuentran en el hipotálamo medio basal y sus axones llegan a la eminencia media. La enzima glutamato decarboxilasa que convierte glutamato en GABA ha sido detectada en neuronas de los núcleos preóptico, dorsomedial, arcuato, supraóptico y en la eminencia media donde hacen sinapsis con neuronas GnRHérgicas. Un alto porcentaje de estas neuronas posee receptores a estrógenos (105).

Tanto la administración de GABA, sus agonistas, o de inhibidores de su degradación, disminuyen la secreción "pulsátil" de la GnRH y de la LH. Sin embargo, la adición de GABA o sus agonistas a fragmentos de eminencia media mantenidos en cultivo, incrementan la secreción de GnRH. Se ha demostrado una disminución del GABA coincidente con el incremento de estradiol, previo al "pico" ovulatorio de LH (94).

6- Histamina (H). Los somas de las neuronas histaminérgicas están localizados exclusivamente en el hipotálamo póstero-lateral. La mayor concentración de H se encuentra en la eminencia media y en menor

proporción en los núcleos arcuato, supraquiasmático y mamilares. Sus axones aparecen distribuidos en la eminencia media y áreas preóptica, periventricular y supraquiasmática y en los núcleos supraóptico, paraventricular y arcuato.

El efecto de la H sobre la secreción de GnRH parece estar mediado por receptores de tipo H1, ya que la administración de agonistas H1 a fragmentos de hipotálamo medio basal obtenido de ratas en diestro, induce un aumento significativo en la liberación del péptido (104, 105).

7- Somatostatina (SR). Los somas de las neuronas productoras de SR que envían proyecciones al hipotálamo se localizan en la porción periventricular anterior del diencéfalo y en la amígdala. Se han descrito sinapsis entre los axones de estas neuronas y las GnRHérgicas del núcleo arcuato. Este neuropéptido parece ejercer un efecto de tipo inhibitorio sobre la secreción de GnRH (105).

8- Neuropéptido Y (NY). Este péptido es particularmente abundante en el núcleo arcuato y en menor proporción en el área preóptica-periventricular. Sus terminales axónicas se distribuyen entre el hipotálamo medio-basal, núcleo supraquiasmático y neuronas de tipo  $\beta$ -endorfinérgicas (92). La administración de NY a ratas hembras, conejas y monas, estimula la liberación de la LH. Este efecto parece ser mediado por neuronas GnRHérgicas ya que la liberación de GnRH aumenta cuando fragmentos de hipotálamo medio basal son perfundidos con NY (15). En el animal castrado, los efectos del NY sobre la secreción de LH es de tipo inhibitorio (118).

9- Oxitocina (Ox), vasopresina (ADH) y factor liberador de córticotrofina (CRF). Los somas de las neuronas productoras de estos neuropéptidos están localizados en los núcleos paraventricular y supraóptico y modulan de manera inhibitoria la liberación de GnRH y de LH (105).

10- Péptido intestinal vasoactivo (VIP). Los somas de estas neuronas están en los núcleos paraventricular y supraquiasmático. El primero envía axones a la eminencia media y a la hipófisis posterior y el segundo al área preóptica periventricular. Resultados de experimentos "in vitro" mostraron un efecto estimulante del VIP sobre la secreción de GnRH (160).

11- Péptidos opíoides - Los somas de las neuronas productoras de prodinorfina se encuentran ubicados en el núcleo paraventricular, donde coinciden con algunas neuronas productoras de CRF y de ADH y sus axones terminan a la altura de la eminencia media. Las que elaboran pro-opio-melanocortina (precursora de la  $\beta$ -endorfina), están en el núcleo arcuato y sus axones alcanzan la eminencia media, finalizando en relación estrecha con los axones de las neuronas GnRHérgicas (105).

La administración de péptidos opioides a la mona y la rata disminuye la frecuencia y amplitud de los "picos" de GnRH e inhibe la liberación de la LH. Los efectos de los péptidos opioides parecen depender, como el de otros neuropéptidos y neurotransmisores, de las concentraciones plasmáticas de hormonas esteroideas (144).

El generador de "pulsos" parece estar controlado o modulado por los elementos neurales que forman parte de esta compleja red anatómica. Las neuronas dopaminérgicas,  $\beta$ -endorfinérgicas y gabaérgicas parecen ser las más importantes dentro de esta red, ya que inhiben la liberación de gonadotropinas, fundamentalmente de la LH. El alto porcentaje de mediadores inhibitorios sobre el generador de "pulsos", podría ser responsable de la baja frecuencia de descarga que éste presenta en el animal adulto (aproximadamente un "pulso" por hora) (105).

Aunque los esteroides sexuales son las sustancias más importantes en el control de la liberación de las gonadotropinas, no se han encontrado receptores a estrógenos en las neuronas GnRHérgicas. Sin embargo se ha mostrado que las interneuronas gabaérgicas, dopaminérgicas y  $\beta$ -endorfinérgicas sí presentan este tipo de receptores, por ello parecería que el control ejercido por los esteroides en la secreción de la GnRH y de las gonadotropinas se realiza por intermedio de estos sistemas de neurotransmisión (105,187).

El aumento de GnRH que inicia la secuencia de eventos neuroendócrinos que llevan a la madurez sexual, es el resultado del incremento en su liberación. En la mona, la administración de n-metil-aspartato, un aminoácido agonista excitatorio, induce la secreción de LH (103), mientras que en la rata se produce pubertad precoz (185). La administración pulsátil de GnRH a monas hembras inmaduras adelanta la primera ovulación y genera un modelo hormonal sérico idéntico al encontrado en la pubertad normal (102,192).

La maduración del sistema secretor de GnRH es modulada por diferentes sistemas de neurotransmisores (105). Existen resultados experimentales que muestran que durante la etapa juvenil, la concentración hipotalámica de NA y DA aumenta progresivamente (2) mientras que disminuye el tono inhibitorio ejercido por los opioides (18). El estradiol parece tener un papel importante en el proceso de maduración hipotalámica por su efecto facilitador de la sinaptogénesis (125), el flujo de impulsos catecolaminérgicos (2, 120,197) y la síntesis de prostaglandina E2 (PGE2) (137).

Las neuronas gabaérgicas, noradrenérgicas, dopaminérgicas y  $\beta$ -endorfinérgicas, pertenecientes al sistema de regulación de la secreción de GnRH, poseen receptores a estrógenos, los cuales actuarían a través de estas interneuronas (63, 78, 89, 161). Entre los péptidos opioides endógenos, la  $\beta$ -endorfina es el más importante en la supresión tónica de la LH (101).

### ***Maduración del sistema GnRHérgico***

Durante la vida fetal temprana del humano, mono rhesus, oveja y rata, la unidad hipotálamo-hipofisaria se diferencia y es funcional de manera autónoma del hipotálamo y la hipófisis maternos, (26, 74, 75, 85). Según Grunbach y Kaplan (85), la inhibición de la descarga hipotalámica de la GnRH y por lo tanto de la secreción de gonadotropinas, podría ser consecuencia de dos mecanismos:

1) el desarrollo del mecanismo inhibitorio ejercido por los estrógenos y la progesterona sobre la unidad hipotálamo-hipofisaria que podría involucrar la maduración de receptores a hormonas esteroideas, tanto en el hipotálamo como en los gonadotropos y

2) la maduración de mecanismos correspondientes al SNC, capaces de suprimir la secreción de la GnRH (85).

### ***Mujer***

Tanto el telencéfalo como el diencefalo están diferenciados a los 34 días de vida intrauterina. A las catorce semanas, están presentes todos los núcleos hipotalámicos y a las dieciséis semanas de gestación el sistema portal hipotálamo-hipofisario está completamente desarrollado anatómica y funcionalmente (179).

La GnRH aparece en el hipotálamo fetal a las ocho semanas de gestación y entre las diez y veintidós semanas, alcanza valores de  $1.53 \pm 0.43$   $\mu\text{g}/\text{mg}$  (10). A las nueve a trece semanas de gestación la GnRH fue detectada por inmunocitoquímica en el soma y los axones de las neuronas con una distribución similar a la del adulto (25). Entre las semanas dieciséis y veintiuna de gestación, las neuronas GnRHérgicas son abundantes en el hipotálamo anterior, la eminencia media y la lámina terminalis, con disminución posterior, desde la mitad de la preñez hasta el término, seguida por un aumento en la etapa neonatal (25).

La hipófisis del humano en cultivo de órganos, responde a la administración de GnRH a partir de la semana diez de vida (83). La mayor concentración de FSH y LH en el feto humano se observa a mitad de la gestación, y disminuye significativamente a partir del inicio del tercer trimestre hacia el término (98).

## **Oveja**

En el hipotálamo de la oveja, se ha detectado GnRH inmunoreactiva a partir de los 58 días de vida intrauterina, con un aumento entre la semana diecisiete y el término (167, 170).

La secreción de la LH es pulsátil a partir de la onceava semana de gestación, lo cual indica de manera indirecta, que la secreción de la GnRH también es pulsátil. En esta especie, como en el humano, la concentración plasmática de las gonadotropinas fetales, es más elevada a mitad de la gestación y disminuyen hacia el término (65).

La administración de GnRH también induce un aumento de la secreción de las gonadotropinas fetales la cual es mayor cuando se realiza a mitad de la gestación, que cuando se realiza al término. Esta disminución en la respuesta a la GnRH se puede atribuir a varios factores: el desarrollo de mecanismos de retrocontrol inhibitorio de los esteroides sexuales, el aumento en la concentración de esteroides circulantes durante el periodo final de la gestación y posiblemente, a la maduración de mecanismos intrínsecos inhibitorios en el SNC. La infusión de estradiol a la oveja preñada, a partir de la semana quince suprime las concentraciones basales de LH y FSH fetales (71).

Hay pocos datos sobre los efectos de neurotransmisores y neuromoduladores respecto a la función hipotálamo-hipofisaria durante el desarrollo fetal de la oveja. Gluckman y cols (75) mostraron que la administración de  $\beta$  endorfina al feto de oveja, incrementa la secreción de la hormona de crecimiento (GH), efecto que es suprimido por la naloxona. La estimulación de la secreción de la GH por la  $\beta$ -endorfina es mucho mayor en el feto de menos de trece semanas de edad. En esta edad, la inyección de naloxona que bloquea los efectos de la  $\beta$ -endorfina sobre la GH, resulta en el aumento de la secreción de LH pero no de la FSH. Cuando la naloxona se administra a fetos de diecisiete semanas disminuye la secreción de la LH (85). Estas observaciones indican la existencia de un efecto tónico supresor de las neuronas opioides hipotalámicas sobre la secreción de LH, hacia la mitad del periodo de gestación, el cual disminuye a medida que aquella avanza. Por lo tanto, los opioides no parecen ser los responsables de la disminución en la secreción de LH que se observa en la gestación tardía (85)

## **Rata**

La GnRH aparece por primera vez en el hipotálamo de feto de rata de diecisiete días de edad. El contenido de GnRH aumenta de manera progresiva desde el nacimiento hasta la pubertad, con dos aumentos bruscos, uno alrededor de la segunda semana de vida y el segundo durante la etapa juvenil.

El sistema de liberación de la GnRH permanece sin cambios durante la etapa prepuberal, en la que las concentraciones plasmáticas de estradiol son bajas. Se han observado "picos" de LH en el animal

infantil y en el juvenil (21-32 días) (99). A partir de esta etapa la secreción pulsátil de la LH se hace más evidente durante la tarde.

Resultados de Ojeda y Urbanski (138) parecen mostrar que las descargas esporádicas de LH en la rata inmadura son una respuesta a la actividad aún desorganizada de las neuronas GnRHérgicas, en tanto que la sincronización vespertina de los "pulsos" indicaría que se completaron las conexiones sinápticas de estas neuronas entre sí y con los otros circuitos de interneuronas que participan en el control del generador de "pulsos".

## II. Nivel hipofisario

Los gonadotropos han sido detectados por primera vez en fetos de las siguientes edades : 49 días en la oveja, 45 días en la cerda, 53 días en el mono. En el feto humano, la LH aparece durante el tercer mes y la FSH a comienzos del cuarto. Ambas gonadotropinas pueden estar localizadas en la misma célula (humano) o en células diferentes (rata) (180).

A partir de los resultados de estudios realizados con técnicas de inmunocitoquímica utilizando antisueros específicos, se considera que la subunidad  $\alpha$  de las gonadotropinas aparece antes que la  $\beta$  y que la  $\beta$  de la LH antes que la de la FSH (180).

Estudios de inmunocitoquímica con microscopía electrónica indicaron que en la rata la aparición de las gonadotropinas se produce a los dieciséis días de gestación. Las características ultraestructurales de los gonadotropos fetales corresponden al de células inmaduras con pocos gránulos de secreción.

A medida que avanza la gestación se inicia el desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y del complejo de Golgi, y el número de gránulos secretorios aumenta paulatinamente. En el feto de cerda a término, los gonadotropos ya presentan las características ultraestructurales correspondientes a las del animal adulto, mientras que en la rata el proceso de maduración continúa después del nacimiento ( 40, 181).

### **Humano**

La alta concentración de FSH y LH en el plasma fetal, parece ser consecuencia de la secreción irrestricta de la GnRH durante la primera mitad de la gestación. A medida que el desarrollo fetal avanza, madura el mecanismo de retrocontrol negativo y el hipotálamo secreta cantidades menores de GnRH, y como consecuencia disminuye la secreción de la FSH y la LH por la adenohipófisis (85).

En la mujer durante la pubertad, se produce un cambio en la amplitud de los pulsos de LH (84, 85, 193).

infantil y en el juvenil (21-32 días) (99). A partir de esta etapa la secreción pulsátil de la LH se hace más evidente durante la tarde.

Resultados de Ojeda y Urbanski (138) parecen mostrar que las descargas esporádicas de LH en la rata inmadura son una respuesta a la actividad aún desorganizada de las neuronas GnRHérgicas, en tanto que la sincronización vespertina de los "pulsos" indicaría que se completaron las conexiones sinápticas de estas neuronas entre sí y con los otros circuitos de interneuronas que participan en el control del generador de "pulsos".

## II. Nivel hipofisario

Los gonadotropos han sido detectados por primera vez en fetos de las siguientes edades : 49 días en la oveja, 45 días en la cerda, 53 días en el mono. En el feto humano, la LH aparece durante el tercer mes y la FSH a comienzos del cuarto. Ambas gonadotropinas pueden estar localizadas en la misma célula (humano) o en células diferentes (rata) (180).

A partir de los resultados de estudios realizados con técnicas de inmunocitoquímica utilizando antisueros específicos, se considera que la subunidad  $\alpha$  de las gonadotropinas aparece antes que la  $\beta$  y que la  $\beta$  de la LH antes que la de la FSH (180).

Estudios de inmunocitoquímica con microscopía electrónica indicaron que en la rata la aparición de las gonadotropinas se produce a los dieciséis días de gestación. Las características ultraestructurales de los gonadotropos fetales corresponden al de células inmaduras con pocos gránulos de secreción.

A medida que avanza la gestación se inicia el desarrollo del retículo endoplasmático rugoso y del complejo de Golgi, y el número de gránulos secretorios aumenta paulatinamente. En el feto de cerda a término, los gonadotropos ya presentan las características ultraestructurales correspondientes a las del animal adulto, mientras que en la rata el proceso de maduración continúa después del nacimiento ( 40, 181).

### ***Humano***

La alta concentración de FSH y LH en el plasma fetal, parece ser consecuencia de la secreción irrestricta de la GnRH durante la primera mitad de la gestación. A medida que el desarrollo fetal avanza, madura el mecanismo de retrocontrol negativo y el hipotálamo secreta cantidades menores de GnRH, y como consecuencia disminuye la secreción de la FSH y la LH por la adenohipófisis (85).

En la mujer durante la pubertad, se produce un cambio en la amplitud de los pulsos de LH (84, 85, 193).

## **Oveja**

A diferencia de lo que ocurre durante la pubertad en la mujer, la mona y la rata, en la oveja durante esta etapa se modifica la frecuencia de los pulsos de LH (65, 69).

El modelo de secreción de LH similar al del animal adulto se establece precozmente. En ovejas gonadectomizadas, se describen pulsos de LH a las seis semanas de vida. Cuando a esos animales se les implantaron cápsulas de silastic con estradiol, estos pulsos se manifestaron a las 27-33 semanas, edad correspondiente al desarrollo del folículo preovulatorio en el animal normal. Por lo tanto, la ausencia de estos pulsos en el animal entero se debería a la acción de retroalimentación inhibitoria ejercida por los esteroides ováricos, fundamentalmente el estradiol (67).

La sensibilidad del sistema que gobierna la secreción pulsátil de la GnRH a los efectos inhibitorios del estradiol, disminuye a medida que el animal se aproxima a la edad de la pubertad. Esto se mostró en ovejas castradas a las tres semanas de edad en las que inmediatamente después de la castración se detectaron pulsos de LH de alta frecuencia. Estos pulsos desaparecieron al realizar un implante de estradiol en cápsulas de silastic a las seis semanas. La remoción de las cápsulas fue seguida por un nuevo aumento en la secreción periódica de LH. Pero a medida que el animal se acercaba a la edad de la pubertad normal (semana 30), la misma concentración de estradiol fue inefectiva para suprimir la liberación periódica de la LH. Esto fue interpretado según la hipótesis del gonadostato y el proceso puberal, como evidencia directa de que en la oveja antes de la pubertad, el mecanismo que gobierna la secreción de la GnRH es altamente sensible al efecto de retrocontrol inhibitorio del estradiol y que la disminución en esta sensibilidad es la responsable del incremento en la frecuencia de los pulsos de LH (67, 71). En esta especie, cuyo ciclo estral está fuertemente vinculado a las estaciones del año, la longitud del ciclo luz/oscuridad y el peso corporal del animal, parecen ser otros factores que intervienen, por intermedio de vías neuroendócrinas aún no bien establecidas, en el desencadenamiento de la pubertad (71).

En la oveja no parece existir un sistema de inhibición mediado por los opioides, capaz de actuar sobre la GnRH (71).

## **Rata**

En la rata, la capacidad de respuesta de los gonadotropos a la GnRH se desarrolla durante los últimos días de la gestación, alcanza un máximo en la segunda semana de vida y disminuye a medida



que el animal se acerca a la pubertad (45, 159). En el día del primer proestro, aumenta la capacidad de respuesta de la hipófisis a la GnRH, por la influencia de la elevada concentración de estrógenos (138).

Además de la FSH y la LH, otras hormonas hipofisarias participan en la regulación de la pubertad. En la rata hembra, la prolactina (PRL) parece estimular el inicio de la pubertad, ya que la hiperprolactinemia induce adelanto de la misma (198), mientras que la inhibición de su secreción por lesiones hipotalámicas la previene (7). En la rata de veinte días de edad, la PRL induce la formación de receptores a la LH en el ovario y el número de estos receptores en las células de la granulosa en los animales hiperprolactinémicos, es mayor que en los animales normales. Este conjunto de datos permite sugerir que esta hormona sensibiliza al ovario a los efectos de la LH (136, 198).

En la etapa prepuberal aumenta la concentración sérica de la GH. Su inhibición retrasa la edad de la apertura vaginal y el desarrollo ovárico, sin que se altere el peso corporal, por lo cual se supone que probablemente participa en el control de la pubertad (3, 47, 135).

Los estrógenos modulan la secreción de las gonadotropinas por sus efectos sobre diferentes sistemas de neurotransmisores que regulan la secreción de GnRH. En el animal castrado la DA y NA inhiben la descarga de GnRH y la estimulan cuando se administran estrógenos.

La angiotensina II, neurotensina, colecistoquinina, serotonina y el NPY, tienen efectos estimulantes sobre la secreción de gonadotropinas, tanto en el animal íntegro como en el castrado tratado con estrógenos, pero son inhibitorias, o carecen de efecto en el castrado sin suplemento estrogénico (103, 104).

Los esteroides sexuales regulan la secreción de las gonadotropinas a varios niveles. Se ha postulado que en el animal prepúber ejercen un efecto inhibitorio sobre su biosíntesis y sobre el SNC. La sensibilidad del sistema disminuye a medida que el animal madura y por lo tanto aumentan la síntesis y liberación de las gonadotropinas, lo que resulta en una mayor secreción de esteroides gonadales (138, 150). Esta hipótesis del gonadostato no ha sido aceptada totalmente, ya que la maduración postraducciona de los péptidos parece ser estimulada por los estrógenos, efecto que es incrementado por la administración concomitante de progesterona (138).

### **III. Nivel ovárico**

El ovario de los mamíferos es un órgano complejo cuya unidad morfológica y funcional es el folículo ovárico. Éste está constituido por : 1) el ovocito primario detenido en la profase de la primera división mitótica, 2) las células granulosa conectadas entre sí y con el ovocito por uniones de tipo nexa, 3) la

que el animal se acerca a la pubertad (45, 159). En el día del primer proestro, aumenta la capacidad de respuesta de la hipófisis a la GnRH, por la influencia de la elevada concentración de estrógenos (138).

Además de la FSH y la LH, otras hormonas hipofisarias participan en la regulación de la pubertad. En la rata hembra, la prolactina (PRL) parece estimular el inicio de la pubertad, ya que la hiperprolactinemia induce adelanto de la misma (198), mientras que la inhibición de su secreción por lesiones hipotalámicas la previene (7). En la rata de veinte días de edad, la PRL induce la formación de receptores a la LH en el ovario y el número de estos receptores en las células de la granulosa en los animales hiperprolactinémicos, es mayor que en los animales normales. Este conjunto de datos permite sugerir que esta hormona sensibiliza al ovario a los efectos de la LH (136, 198).

En la etapa prepuberal aumenta la concentración sérica de la GH. Su inhibición retrasa la edad de la apertura vaginal y el desarrollo ovárico, sin que se altere el peso corporal, por lo cual se supone que probablemente participa en el control de la pubertad (3, 47, 135).

Los estrógenos modulan la secreción de las gonadotropinas por sus efectos sobre diferentes sistemas de neurotransmisores que regulan la secreción de GnRH. En el animal castrado la DA y NA inhiben la descarga de GnRH y la estimulan cuando se administran estrógenos.

La angiotensina II, neurotensina, colecistoquinina, serotonina y el NPY, tienen efectos estimulantes sobre la secreción de gonadotropinas, tanto en el animal íntegro como en el castrado tratado con estrógenos, pero son inhibitorias, o carecen de efecto en el castrado sin suplemento estrogénico (103, 104).

Los esteroides sexuales regulan la secreción de las gonadotropinas a varios niveles. Se ha postulado que en el animal prepúber ejercen un efecto inhibitorio sobre su biosíntesis y sobre el SNC. La sensibilidad del sistema disminuye a medida que el animal madura y por lo tanto aumentan la síntesis y liberación de las gonadotropinas, lo que resulta en una mayor secreción de esteroides gonadales (138, 150). Esta hipótesis del gonadostato no ha sido aceptada totalmente, ya que la maduración postraducciona de los péptidos parece ser estimulada por los estrógenos, efecto que es incrementado por la administración concomitante de progesterona (138).

### **III. Nivel ovárico**

El ovario de los mamíferos es un órgano complejo cuya unidad morfológica y funcional es el folículo ovárico. Éste está constituido por : 1) el ovocito primario detenido en la profase de la primera división mitótica, 2) las células granulosas conectadas entre sí y con el ovocito por uniones de tipo nexo, 3) la

lámina basal que las rodea, 4) células de la teca dispuestas alrededor de la membrana basal, vasos sanguíneos y linfáticos que no llegan a la capa granulosa (Figura 3).

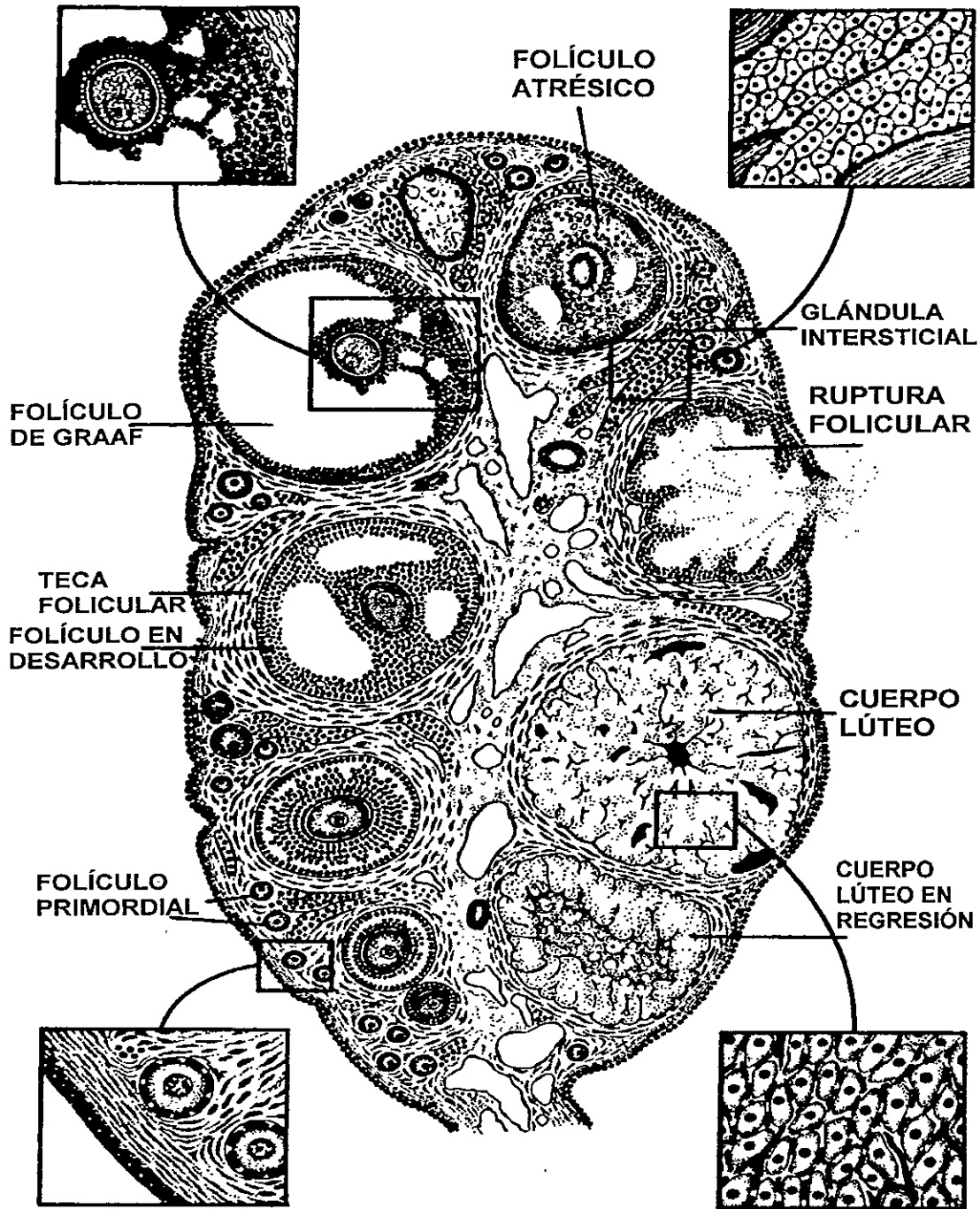


Figura 3. Esquema de un ovario de mamífero. Se observan las diferentes etapas del desarrollo folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. Tomado de Feder HH (1981).

El folículo ovárico tiene un proceso de maduración y desarrollo que se inicia con el folículo primordial constituido por el ovocito y una capa de células granulosa aplanadas. Dependiendo de la especie, esta

etapa se completa durante el desarrollo fetal (humano, mono rhesus, cobaya) o en la etapa perinatal (rata, coneja, armiño). A partir de este momento las etapas siguientes en el ciclo de vida del folículo pueden detenerse por lapsos de tiempo prolongados (días a décadas) hasta que una o varias señales desconocidas hasta el presente, lo inducen a continuar su proceso de crecimiento y maduración (157).

Los cambios más evidentes de este proceso son: el aumento de tamaño del ovocito, las células de la granulosa cambian su forma de aplanadas a cuboidales, se dividen por mitosis y se forma la zona pelúcida. Los ciclos mitóticos sucesivos de las células granulosas resultan en un aumento de hasta 60 veces el volumen del folículo (157).

Cuando se completan de tres a cuatro capas de células granulosas, los capilares invaden la zona fibrosa que rodea al ovocito y junto con las células teco-intersticiales constituyen la teca interna (157). Esta fase, llamada preantral, finaliza cuando entre las células granulosas aparecen acúmulos multifocales de fluido que se constituye por extravasación del plasma (60), y que contiene diferentes sustancias elaboradas por las células granulosas en respuesta al estímulo de la FSH (14, 60).

A medida que aumenta la cantidad de líquido se constituye una cavidad que lo contiene: el antro folicular, por lo cual las etapas posteriores del desarrollo del folículo se conocen como fases antrales. Junto con el desarrollo del antro, las células tecales aumentan de tamaño contribuyendo al incremento de diámetro del folículo.

Antes de la pubertad, el desarrollo de los folículos antrales termina en la muerte y degeneración del ovocito y de las células granulosas así como en la diferenciación de las células tecales que son incorporadas a células del estroma constituyendo la glándula intersticial. El resultado de este proceso se conoce como atresia (28).

Durante la etapa peripuberal, uno o varios folículos antrales continúan su crecimiento y alcanzan el tamaño de un folículo preovulatorio. Éstos, ubicados cerca de la superficie libre del ovario pueden romperse liberando al ovocito.

La ovulación es seguida por una serie de cambios en las células de la granulosa (luteinización), las cuales se mezclan con fibroblastos, vasos sanguíneos y células tecales para dar origen al cuerpo lúteo, que se constituye en la mayor fuente de hormonas esteroideas después de la ovulación (157). Estos cambios morfológicos dependen de variaciones hormonales. En términos generales la mayoría de los autores concuerda en que el desarrollo del folículo preantral es independiente de las gonadotropinas. Por el contrario el de los folículos antrales depende de éstas y además de hormonas esteroideas (81).

## La inervación del ovario

El ovario de los mamíferos recibe su inervación simpática por el plexo ovárico que es una extensión de los plexos aórtico y renal y del nervio ovárico superior (21, 24). Las neuronas cuyos axones constituyen el plexo ovárico se localizan en los segmentos T10 y T11 de la médula espinal. El nervio ovárico superior es rama del plexo celíaco y los somas neuronales están localizadas en los ganglios de la raíz dorsal, de T7 a L2 y en los ganglios paravertebrales de los segmentos T10 a L3 (23,24). En la rata se ha mostrado que en la inervación del ovario participan fibras provenientes del vago (22).

Las fibras nerviosas penetran al ovario por el plexo perivascular que acompaña a la arteria ovárica, por el nervio ovárico superior y el nervio vago (22, 109) Se distribuyen en el tejido conectivo intersticial y luego se relacionan con las células tecales de los folículos (174), la glándula intersticial y los miocitos lisos perifoliculares (176, 186); las células de la granulosa y el ovocito carecen de inervación (21) (Figura 4).

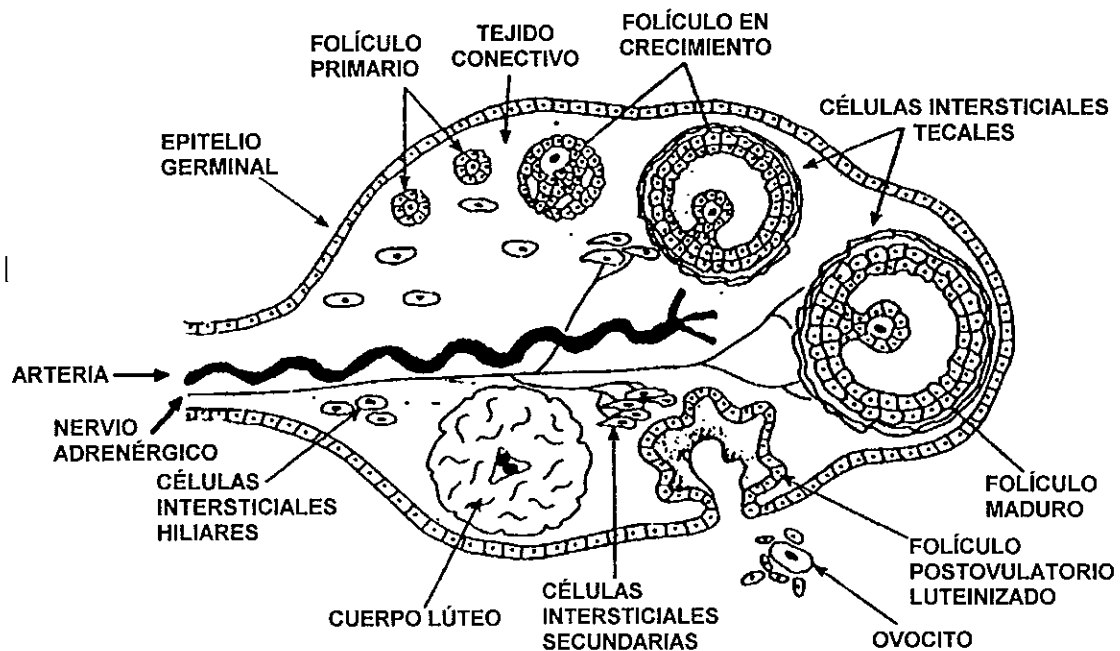


Figura 4. Esquema de la distribución de las fibras adrenérgicas en el ovario de mamífero. Tomado de Tresguerres F (1992)

Aunque la distribución es similar en todas las especies de mamíferos estudiadas, la riqueza de fibras nerviosas y el contenido en noradrenalina es diferente (Tabla 2).

Tabla 2. Contenido de noradrenalina en el ovario de varios mamíferos.

Especie	Concentración ( $\mu\text{g/g}$ )
Coneja	$0.22 \pm 0.02$
Cerda	$0.25 \pm 0.04$
Mona rhesus	$0.35 \pm 0.06$
Criceto	$0.41 \pm 0.09$
Rata	$0.50 \pm 0.03$
Ratona	$0.63 \pm 0.11$
Mujer	$0.86 \pm 0.30$
Vaca	$1.96 \pm 0.20$
Cobaya	$2.29 \pm 0.35$
Gata	$4.93 \pm 1.30$

(Modificado de Burden, 1985)

La inervación adrenérgica parece jugar un papel importante en la regulación de la función ovárica y podría participar en la modulación del proceso de desencadenamiento de la pubertad.

La sección del meso ovárico, o la vagotomía bilateral a nivel subdiafragmático, alteran el ciclo estral de la rata, aunque no lo elimina (91). En la ratona la sección del vago abdominal produce una severa alteración del ciclo estral, lo cual permite sugerir que el nervio vago podría estar involucrado en este efecto (90).

Grob (82) denervó unilateralmente el ovario de ratonas inmaduras y encontró que el ovario denervado no presentaba desarrollo folicular, en tanto que el contralateral tenía folículos en diferentes etapas de maduración y cuerpos lúteos. La denervación bilateral produjo retraso de la primera apertura vaginal y ausencia de ciclos estrales, y los ovarios no presentaron desarrollo folicular ni presencia de cuerpos lúteos. Los ciclos estrales se iniciaron luego de la administración parenteral de noradrenalina. Estos resultados lo hicieron postular que para el desarrollo folicular normal es necesaria la liberación de noradrenalina, previa a la estimulación de las gonadotropinas. Este postulado fue apoyado por resultados de Brink y Grob (27) quienes mostraron que en la ratona inmadura con denervación ovárica, la administración secuenciada de PMSG-hCG carecía de efecto.

En la rata adulta, la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior, realizada en cada uno de los días del ciclo estral, modifica la ciclicidad y la ovulación (31). Cuando este mismo tratamiento se realiza en el animal prepúber, no se modifica la edad de la apertura vaginal pero si el porcentaje de animales

ovulantes al primer estro, la ovulación compensadora que sigue a la hemicastración y el número de folículos de diámetro mayor a las 100  $\mu\text{m}$  (123).

En ratas en diestro la estimulación del nervio ovárico superior reduce la concentración plasmática de progesterona. La administración de propanolol, bloqueador  $\beta$ 2- adrenérgico, no modifica este resultado, pero la de fentolamina, bloqueador  $\alpha$ -adrenérgico, revierte este efecto (191). Los autores consideran que la esteroidogénesis ovárica sería regulada por los receptores adrenérgicos: los de tipo  $\beta$ 2 de manera estimulante y los de tipo  $\alpha$  en forma inhibitoria.

La hemicastración es seguida por hipertrofia compensadora del ovario remanente, mismo efecto que se obtiene con la sección nerviosa unilateral del nervio ovárico superior izquierdo (9, 122). La destrucción unilateral de la inervación noradrenérgica con 6-hidroxidopamina también resulta en hipertrofia compensadora del ovario intacto y la aplicación local de esta droga bloquea el desarrollo de la hipertrofia compensadora (73). El mismo resultado se obtuvo con la administración de novocaína en el meso-ovario antes de la hemicastración (48).

La denervación farmacológica también ha sido utilizada como herramienta para analizar si la inervación del ovario participa en la regulación de la ovulación y de los mecanismos que desencadenan la pubertad. En la rata adulta, la administración crónica de guanetidina, bloqueador noradrenérgico que no atraviesa la barrera hematoencefálica, modifica el ciclo estral y disminuye el número de ovocitos liberados (50). La administración de este fármaco a la rata prepúber, produce retraso de la primera apertura vaginal, con aumento del número de ovocitos liberados en el primer estro (62). La respuesta opuesta a la denervación farmacológica podría deberse a diferencias funcionales entre el animal adulto y el prepúber.

### **Rata**

No existen evidencias de que las gonadotropinas plasmáticas participen en la regulación del desarrollo del ovario fetal de la rata. La presencia de receptores ováricos a estas hormonas aparecen en ratas de cuatro a cinco días de edad (184). Estas evidencias llevaron a pensar que el desarrollo folicular en esta etapa es independiente de las gonadotropinas, dado que ni la administración de PMSG o de FSH (141) ni la inmunoneutralización de las gonadotropinas endógenas altera el número de folículos que comienzan a crecer durante los primeros días de vida postnatal (142). En el día uno de vida no se observan folículos primordiales, pero durante el día dos, llegan a 1300. En el ovocito se demostró un aumento en la expresión del gene a la neurotropina 4 durante las horas que preceden a la formación de

los primeros folículos primordiales (72). El otro factor que podría estar involucrado en este desarrollo folicular, podría ser el VIP el cual fue encontrado en el ovario de la rata, antes de la formación de los primeros folículos primordiales (138)

En el ovario de la rata prepúber se ha mostrado la presencia de receptores a gonadotropinas. Durante el periodo infantil se desarrollan los receptores a la FSH y en el juvenil los de la LH (173). A medida que el animal madura aumenta el número de receptores para cada una de las gonadotropinas, lo que se correlaciona con la capacidad de la LH en inducir la secreción de hormonas esteroideas (173). El ovario de rata también posee receptores  $\beta$ -adrenérgicos tipo A2, cuya activación por agonistas induce la secreción de progesterona, testosterona, androstenediona y estradiol (4).

### **Oveja**

El ovario fetal de la oveja, presenta folículos antrales que a partir de las semanas dos a cuatro de edad responden a la administración de gonadotropinas, momento en el cual las capas tecal y granulosa están bien desarrolladas (99, 117). La administración secuencial de PMSG y de hCG a animales de cinco y seis semanas de edad, induce ovulación y formación de un cuerpo lúteo (195). Las gonadotropinas inyectadas pueden estimular el crecimiento folicular, aumentando la producción de estradiol, el que a su vez activa el mecanismo del "pico" preovulatorio de gonadotropinas de manera similar a lo que ocurre durante la fase folicular normal.

Los folículos del ovario de ovejas de diez a dieciséis semanas de edad, estimulados "in vitro" con gonadotropinas, secretan esteroides sexuales en cantidades similares a las de un animal adulto (183). En ovejas de veinte semanas de edad la administración horaria de LH de ovino purificada, durante 48 horas, aumenta la concentración plasmática de estradiol a cantidades similares a los de la fase folicular, se induce el "pico preovulatorio" de LH, la ovulación y la formación de un cuerpo lúteo funcional (69). Cuando los pulsos de LH administrados fueron de la misma amplitud, pero de baja frecuencia, no se produjo la ovulación. Por lo tanto las bajas concentraciones de estradiol secretadas por el ovario de la oveja prepúber se deben a que los pulsos de LH no tienen la frecuencia adecuada, más que a la inmadurez del ovario (71).



## PUBERTAD EN LAS ESPECIES NO PRIMATES

En la mayoría de las especies, el desarrollo sexual sigue un patrón similar al de la especie humana, con una fase inicial de secreción no reprimida de gonadotropinas, gradualmente modificada por la influencia de retrocontrol inhibitorio ejercida por los esteroides placentarios o gonadales. Luego sigue una fase juvenil caracterizada por la inhibición central de secreción hipotalámica de la GnRH, seguida por la fase puberal con su descarga pulsátil, en la que aumenta la frecuencia y amplitud de los "pulsos", asociada con la disminución al efecto de retrocontrol inhibitorio de los esteroides sexuales (113).

En los primates, la primera fase comienza antes del nacimiento y continúa durante la niñez y posteriormente la influencia combinada de los esteroides de origen gonadal imponen un modelo de secreción de las gonadotropinas que es sexualmente dimórfico y bifásico (103, 144).

En animales domésticos como la oveja y la ternera, esta primera fase se completa antes del nacimiento, por lo cual no existe un "pico" de secreción de gonadotropinas en la etapa neonatal (68, 113).

En la oveja y probablemente en la ternera, la fase juvenil de inhibición central de la descarga de la GnRH, es más breve que en los primates ya que la secreción pulsátil de la LH y el aumento de la concentración plasmática de las gonadotropinas que sigue a la castración puede observarse pocas semanas después del nacimiento (68). En estas especies, la pubertad comienza como un proceso gradual que se completa entre las 35 y 50 semanas de edad y se caracteriza por un aumento tanto en el pulso de secreción de la LH, como de la sensibilidad gonadal a la estimulación gonadotrópica; ambos eventos se asocian a una disminución brusca en la sensibilidad hipotalámica al control de retrocontrol inhibitorio de los esteroides muy cerca del momento de la primera ovulación.

El ovario de la oveja inmadura estimulado con gonadotropinas produce cantidades altas de estradiol, que puede gatillar el "pico" preovulatorio de LH. En el ovino el factor limitante en la progresión de la pubertad es la desinhibición de un mecanismo que limita la frecuencia de los pulsos de GnRH a menos de una descarga por hora. La administración de LH a la oveja prepúber no adelanta la pubertad espontánea, ya que al suspender el tratamiento con LH, el cuerpo lúteo formado involuciona y los animales reinician espontáneamente sus ciclos estrales alrededor de las 30 semanas de vida (69, 70, 71). Antes de la pubertad, los "pulsos" de LH se presentan cada dos a tres horas y a medida que el animal se acerca a la pubertad el intervalo entre los "pulsos" se va haciendo menor. Por el contrario, entre las diez y las doce semanas de vida la concentración plasmática de FSH es similar a la de la hembra adulta (65).

Aunque aparentemente en la oveja la concentración plasmática de FSH no varía durante la etapa de inmadurez sexual, sí cambia la relación entre sus formas inmuno y bioactivas, ya que estas últimas son mayores en el animal puberal que a edades más tempranas. El aumento en la bioactividad está asociado a la aparición de las isoformas menos ácidas. Este aumento en la potencia biológica de la FSH parece ser secundario al incremento en los esteroides ováricos, ya que la administración de GnRH no modifica los modelos de distribución de las isoformas de la hormona circulante en ausencia de los ovarios (139).

En la oveja por lo tanto, la pubertad se produce por un aumento en la frecuencia de liberación de la GnRH, lo que produce un incremento en la frecuencia de descarga de la LH la cual, a su vez, estimula la secreción de esteroides por el ovario y éstos la secreción de isoformas de FSH con mayor potencia biológica (71). Esto podría llevar a suponer que el sistema neuroendócrino de la oveja prepuberal no está lo suficientemente desarrollado como para producir "pulsos" de GnRH de alta frecuencia. Sin embargo la hipófisis de la oveja recién nacida parece ser capaz de responder a la GnRH, ya que la castración en la etapa postnatal es seguida por pulsos horarios de LH que reflejan una secreción similar de la GnRH y que son idénticos a los de la fase folicular de la oveja adulta,

### ***La cobaya como modelo de estudio***

Aunque de todos los mamíferos pequeños utilizados en el estudio de la biología de la reproducción, la cobaya es la que más se parece a la mujer por su ciclo estral largo, ovulación espontánea y la presencia de un cuerpo lúteo funcional, los mecanismos que regulan la pubertad y la ovulación no han sido estudiados tan extensamente como ocurre con la rata.

Dependiendo de la cepa, la primera apertura vaginal se produce entre los veintitrés y 65 días de vida y la duración del primer estro varía entre cuatro y trece días (35, 121, 149). Los ovarios de los animales autopsiados durante esta etapa presentaron cuerpos lúteos, lo que indica que se produjo la ovulación.

Aunque no existen muchos datos en la literatura, se sabe que en la cobaya como en la mujer y en la oveja, la unidad hipotálamo-hipofisaria se desarrolla durante la vida intrauterina. Las neuronas GnRHérgicas migran caudalmente desde la placoda olfatoria y alcanzan al núcleo arcuato-infundibular, la eminencia media y los núcleos premilares (106, 107, 167, 168). Los axones de las neuronas GnRHérgicas provenientes de las áreas preóptica (29), pericomisural anterior y del núcleo arcuato terminan en la eminencia media (16, 106, 164, 165, 166, 169), pero sólo el núcleo arcuato parece ser esencial para mantener la secreción de gonadotropinas. El primer indicio de la síntesis de la GnRH,

medido por técnicas de inmunocitoquímica, aparece en el día 28 de vida intrauterina, etapa que coincide con el inicio de la inmunoreactividad para la cadena  $\beta$  de la LH en la adenohipófisis (165).

ter Haar (177) administró LH-RH a cobayas preñadas y midió por radioinmunoanálisis las concentraciones plasmáticas de LH en las madres y sus fetos en diferentes etapas de la gestación. Además de ser independiente de la concentración hormonal materna, la concentración de LH en el plasma fetal es alta entre los días 50 y 68 de gestación (2.04 a 4.95 ng/ml) (Figura 5). La administración de LH-RH al feto induce la secreción de LH, pero no de FSH, aunque el tratamiento con ambas hormonas promueve el desarrollo sexual (177).

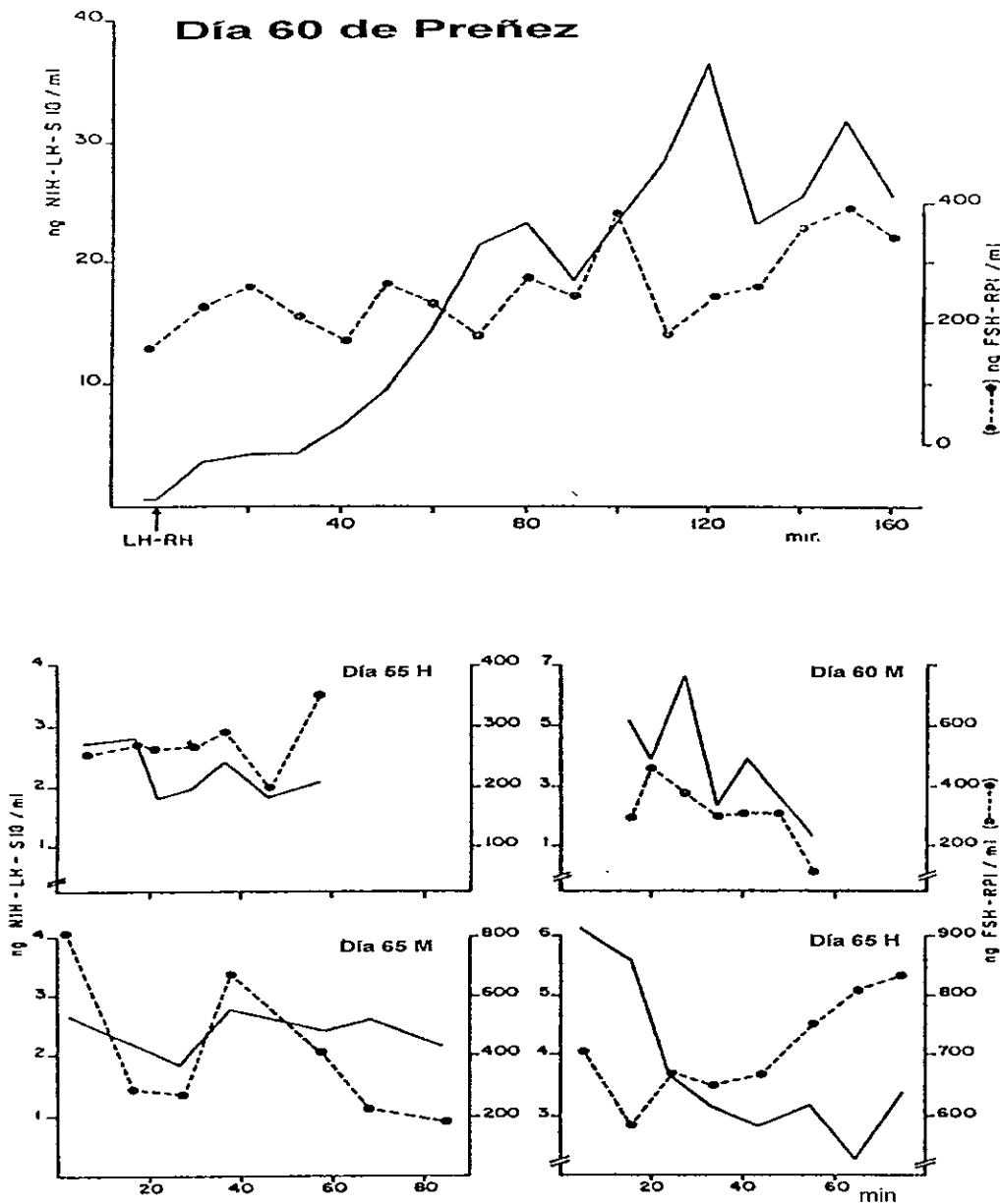


Figura 5. Panel superior. Cambios en las concentraciones plasmáticas de LH (ng NIH-LH-Si8/ml) y de FSH (ng FSH-Rpi/ml) después de la administración de 1000 ng de LH-RH a una cobaya preñada, en el día 60 de la gestación.

Panel inferior. Cambios en la concentración plasmática de LH (ng NIH-LH-Si8/ml) y de FSH (ng FSH-Rpi/ml) en muestras seriadas de sangre obtenidas de los fetos machos (M) o hembras (H) en los días 55, 60 y 65 de gestación. Tomada de ter Haar, 1976.

La información sobre las concentraciones plasmáticas de FSH y LH durante la etapa pre y peripuberal de la cobaya es escasa. Croix (34) observó un aumento brusco en la concentración plasmática de LH ("pico" de LH: 1.7 a 6.6 ng/ml) a los ocho días de vida y concentraciones altas de FSH (100 a 230 ng/ml) entre los días siete y diez. En tanto que los valores observados por Donovan y cols (56, 57) y Donovan y Kilpatrick (55) son más elevados, con el pico de LH en el día diez de vida postnatal y

pocos cambios en la concentración de FSH (300 ng/ml promedio). En el momento de la pubertad existe un "pico" en la secreción de la LH (55).

Con base en estos datos, Donovan (52) postula que en la cobaya prepúber la FSH y la LH tienen una acción permisiva sobre el inicio de la pubertad, pero que las hormonas fisiológicamente activas en el control de este evento aún no han sido identificadas.

Según Rowlands y Parkes (158), la administración de gonadotropinas a la cobaya inmadura estimula el crecimiento folicular y la secreción estrogénica que actúa sobre el útero y la vagina, pero no es capaz de inducir la ovulación. Mills y Reed (121), mostraron que la administración de una sola dosis de un homogeneizado de hipófisis anterior, de FSH o de LH, son capaces de provocar la ovulación siempre que se administren durante la "etapa crucial", es decir pocos días antes de la edad de pubertad normal. El mismo esquema experimental aplicado a animales más jóvenes sólo indujo luteinización.

Con base en la bibliografía consultada, no se encontraron estudios sobre los efectos de prolactina en el inicio de la pubertad de la cobaya, pero la aplicación iontoforética de prolactina en el área septal y preóptica de cobayas adultas, produjo el aumento en la velocidad de descarga espontánea de algunas neuronas, fundamentalmente del área preóptica (147, 148).

Para tratar de saber si la inmadurez del ovario era el factor preponderante en el advenimiento de la pubertad en la cobaya, Donovan y Peddie (54) injertaron ovarios fetales, de animales recién nacidos, de quince, 25 días de edad o adultos, bajo la cápsula renal de cobayas adultas castradas. La primera apertura vaginal se produjo diez días después del tratamiento cuando los injertos fueron obtenidos de los animales de quince o 25 días de edad o de animales adultos. En cambio, transcurrieron entre veinticuatro y 33 días cuando el ovario injertado provino de fetos o de animales recién nacidos. Con base en estos resultados, los autores concluyen que la edad cronológica del ovario determina su respuesta a las gonadotropinas (54).

Los efectos de la castración en animales prepúberes sobre las concentraciones plasmáticas de la FSH y la LH parecen depender de la edad en que se realiza la cirugía. Cuando la castración se realizó entre los días cero y diez de vida, se observó diez días después, un aumento significativo de las concentraciones plasmáticas de la FSH y de la LH (54, 56, 57), mientras que si la castración se realizó en animales de más de 30 días, el aumento en la concentración de la LH se produjo a los tres días (128, 129).

En el ovario fetal los primeros folículos primordiales aparecen a los 48 días de vida intrauterina como acúmulos celulares ubicados en la zona cortical profunda. A los 56 días presentan varias capas de células granulosas y se encuentran por primera vez folículos primarios (19). El ovario de la cobaya recién nacida posee folículos antrales ( $14 \pm 3.4$ ), cuyo número aumenta a 171 en el día quince y a 207 en el día veinte (140). A los quince días de vida se encuentran por primera vez folículos atrésicos. Los folículos antrales tienen un diámetro máximo de 284  $\mu\text{m}$  en el día cero, 570  $\mu\text{m}$  en el día quince y 1045 en el día de la apertura vaginal (79). Las concentraciones plasmáticas de la FSH y la LH no se correlacionan con el aumento en el número de folículos antrales que se observa durante los primeros quince días de vida, ya que la concentración de la FSH disminuye después del nacimiento y sube recién a los 45 días de edad, es decir, ya en el animal adulto (57), mientras que la de LH aumenta alrededor del día diez de vida y se mantiene constante hasta los 45 días (56).

Animales castrados a los quince días en los que se realizó el autoinjerto de los ovarios, se adelantó la edad de la apertura vaginal, lo que indica que hubo secreción de estrógenos (151). Dado que este adelanto en la secreción estrogénica no sería el resultado del aumento de las concentraciones plasmáticas de FSH y LH, podemos presumir que las modificaciones en la inervación del ovario producidas por su extirpación y autoinjerto serían responsables de este adelanto.

La hemicastración en los días quince, 25 o 35 de edad, no es seguida por hipertrofia compensadora del ovario *in situ* (54) como ocurre con el animal puberal o en el adulto. Pero cuando la hemicastración de animales de quince días, es acompañada por autoinjerto del ovario, en el ovario *in situ* se observó una hipertrofia compensadora del 67% (153).

Una de las teorías más aceptadas para explicar el inicio de la pubertad, establece que durante la etapa prepuberal, se produce una alteración en el mecanismo de retrocontrol inhibitorio de los estrógenos sobre la secreción gonadotrópica (44, 149). Esta hipótesis se basa en observaciones realizadas en varias especies, en las que se demostró que los estrógenos tienen un efecto estimulante de la secreción de LH cuando son administrados cerca del momento de la primera ovulación. Este efecto no se produce en los animales más jóvenes (67, 70)

La administración de GnRH a cobayas castradas a los diez, 30, 50 y 150 días de edad, induce un aumento en la concentración plasmática de la LH diez días después. Esta acción de la GnRH es bloqueada por el benzoato de estradiol en dosis de 0.5 a 2  $\mu\text{g}/\text{K}$  cuando se inyecta entre quince y veinte días después de la castración (128).

El tratamiento a cobayas prepúberes de 30 días con 10 µg de benzoato de estradiol o de 1.5 µg seguidos de 1 mg de progesterona, carece de efecto sobre las concentraciones plasmáticas de LH, pero ambos tratamientos inducen la liberación de la hormona cuando se realizan a los 46 días (128, 129). Los autores concluyen que en la cobaya el sistema de retrocontrol estimulante de los estrógenos comienza a funcionar entre los días 30 y 46 de vida, asociado con un aumento en la capacidad del eje hipotálamo-hipofisario para estimular la descarga de la LH (127, 128, 129)

La administración de estradiol a cobayas recién nacidas provocó a los 40 días, luteinización folicular en la mayoría de los animales mientras que sólo el 30 % de los tratados con progesterona y ninguno de los tratados con testosterona presentaron luteinización teal. El implante subcutáneo de estradiol aumentó la atresia folicular, el de testosterona la disminuyó, en tanto que la progesterona no tuvo efecto. Los autores concluyen que el ambiente esteroideo parece influir sobre la maduración folicular, de manera independiente de las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas (178).

El implante de estrógenos a cobayas hemicastradas a los quince, 25 ó 35 días de edad, induce adelanto de la edad de la apertura vaginal e hipertrofia uterina, pero no la hipertrofia compensadora del ovario. La descarga de gonadotropinas no fue bloqueada por los estrógenos, ya que en los ovarios *in situ* se produjo luteinización folicular (53). Todos estos resultados llevan a Donovan (52) a postular que la pubertad de la cobaya sería inducida por la eliminación de un sistema de restricción que actúa sobre la liberación de LHRH. Como los sistemas de retrocontrol estimulante de los esteroides ováricos se establecen entre los días 30 y 46 de vida postnatal, sólo durante este periodo los diferentes tratamientos pueden modificar la edad de la pubertad.

Sin embargo, datos previos de nuestro laboratorio muestran que la administración de 100 UR de hCG o de 10 mg de enantato de testosterona (ET) durante los cinco primeros días de vida de la cobaya, inducen una pubertad precoz, (apertura vaginal a los 37 días para los animales tratados con hCG y 34 días para los que recibieron ET vs. 69 en los testigos sin tratamiento) con presencia de cuerpos lúteos en el ovario y seguida por ciclos estrales normales (41).

La inyección de 100 mg de benzoato de estradiol (EB) durante los cinco primeros días de vida, también demostró ser efectiva en adelantar la pubertad (119). Estos datos parecen apoyar la hipótesis de que en la cobaya recién nacida, el sistema de retroalimentación estrogénico estimulante que controla la secreción de gonadotropinas, puede comenzar a funcionar por un aumento en la concentración estrogénica plasmática (119).

La presencia de nervios adrenérgicos perivascuales se ha mostrado en la médula del ovario de cobayas de 50-60 días de vida intrauterina. Desde el día del nacimiento, los nervios comienzan a extenderse hacia el estroma; por el día veinte ya se encuentran en la teca de los folículos antrales y en el día 28 alcanzan la teca de los folículos tanto atrésicos como en desarrollo, y a la glándula intersticial con una distribución similar a la del animal adulto y un incremento altamente significativo en la concentración de NA (24). Este incremento en la inervación adrenérgica ovárica y el contenido en NA coincide temporalmente con el aumento de la atresia folicular descrita por Peddie (140), lo que permite sugerir que los nervios adrenérgicos pueden estar involucrados en la regulación del proceso de atresia y formación de la glándula intersticial.

La simpatectomía producida por la administración de 6-hidroxidopamina en el animal recién nacido no modifica el peso del ovario, el número total de folículos, ni induce ovulación, pero aumenta el número de folículos preantrales (mayores de 700  $\mu\text{m}$  de diámetro) y el índice de atresia en los de 300-500  $\mu\text{m}$ , lo que permite sugerir que en el animal prepúber la inervación simpática inhibe el desarrollo de los folículos antrales grandes (39).

La denervación farmacológica con guanetidina a la dosis de 20 mg/K, administrada a cobayas recién nacidas, indujo apertura vaginal adelantada, con presencia de cuerpos lúteos en los ovarios (154).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Dado que la inervación catecolaminérgica del ovario regula los mecanismos que desencadenan la pubertad en la rata, modulando la sensibilidad del órgano a las gonadotropinas y el desarrollo folicular, se decidió analizar los efectos de la denervación farmacológica periférica en la cobaya, especie con una inervación más abundante que la rata. Además, como los mecanismos neuroendócrinos que regulan la función del ovario parecen ser lateralizados, se estudió la participación de la inervación periférica en los mecanismos de hipertrofia compensadora en el animal hemicastrado. Como herramienta farmacológica para producir la denervación simpática periférica, se utilizó la guanetidina.



## GUANETIDINA

La guanetidina (GTD) puede ser considerada como el agente bloqueador tipo de las neuronas adrenérgicas, cuyo efecto primario es producir una disociación entre el potencial de acción y la descarga de noradrenalina (NA) en la terminal nerviosa. Después de la administración de una sola dosis de GTD radiomarcada, su localización por autorradiografía demostró que es excluida del SNC por la barrera hematoencefálica. Se acumula activamente en la neuronas simpáticas periféricas por la bomba de captación de catecolaminas y produce la descarga de la NA endógena desde las terminales. Por su capacidad de bloquear tanto la captación de NA como su liberación, lleva a la reducción en la concentración de este neurotransmisor (96). Es rápidamente transportada a su sitio de acción intraneuronal a partir del cual es eliminada con una vida media de cinco días. Aproximadamente el 50% de la droga es metabolizada y el otro 50% es eliminada sin cambios por la orina. Por su larga vida media las dosis pueden acumularse durante dos semanas (133). Contiene un anillo no aromático, nitrogenado, con dos puentes de C que lo separan de un grupo guanidinium no sustituido (Figura 6).

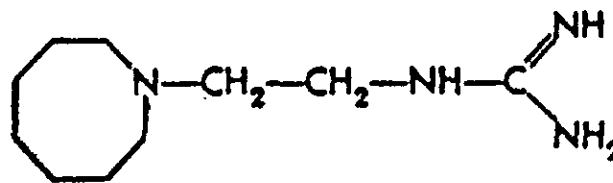


Figura 6. Estructura de la Guanetidina. Tomada de Oates JA.

Aunque su mecanismo de acción no ha sido completamente aclarado, se han postulado tres posibilidades:

1- Inhibición de la fosforilación oxidativa. En las neuronas simpáticas periféricas, la administración de GTD resulta en cambios degenerativos en las mitocondrias, observados con microscopía electrónica, que incluyen edema y pérdida de las crestas y ausencia completa de la actividad de la citocromo-oxidasa en el compartimiento mitocondrial externo (88). Pero estos cambios ultraestructurales también se encuentran en la hipoxia y en la deficiencia de ácido ascórbico, por lo que parecen ser inespecíficos (96)

2- Factor de crecimiento nervioso. Dado que la destrucción de las neuronas simpáticas producida por la GTD puede ser evitada por la administración del factor de crecimiento nervioso (NGF), se propuso que el efecto de la droga podría deberse a interferencia con la acumulación de este factor trófico transportado de manera retrógrada hacia el soma neuronal (95).

3- Mecanismo autoinmune. En la rata, la muerte neuronal inducida por la GTD es precedida por la aparición a nivel de los ganglios simpáticos, de un infiltrado linfocitario de linfocitos pequeños, linfocitos activados, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Este infiltrado no se encuentra en el animal irradiado y reaparece en el irradiado transferido con células inmunocompetentes (115).

## Hipótesis

La pubertad de la cobaya está regulada, entre otros factores, por un mecanismo de retrocontrol estimulante de los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas, asociado a la pérdida del mecanismo inhibitorio que ejercen las catecolaminas sobre el desarrollo folicular.

## Objetivos generales<sup>1</sup>

- Analizar las modificaciones inducidas por la denervación noradrenérgica periférica sobre la pubertad de la cobaya.
  - Analizar la participación de la inervación noradrenérgica del ovario en los mecanismos que regulan la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario (lateralización).
  - Estudiar los efectos del estímulo secuencial con gonadotropinas sobre la pubertad de la cobaya.
- <sup>1</sup> Los objetivos particulares están detallados al inicio de cada experimento.

2- Factor de crecimiento nervioso. Dado que la destrucción de las neuronas simpáticas producida por la GTD puede ser evitada por la administración del factor de crecimiento nervioso (NGF), se propuso que el efecto de la droga podría deberse a interferencia con la acumulación de este factor trófico transportado de manera retrógrada hacia el soma neuronal (95).

3- Mecanismo autoinmune. En la rata, la muerte neuronal inducida por la GTD es precedida por la aparición a nivel de los ganglios simpáticos, de un infiltrado linfocitario de linfocitos pequeños, linfocitos activados, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares. Este infiltrado no se encuentra en el animal irradiado y reaparece en el irradiado transferido con células inmunocompetentes (115).

## Hipótesis

La pubertad de la cobaya está regulada, entre otros factores, por un mecanismo de retrocontrol estimulante de los estrógenos sobre la secreción de las gonadotropinas, asociado a la pérdida del mecanismo inhibitorio que ejercen las catecolaminas sobre el desarrollo folicular.

## Objetivos generales<sup>1</sup>

- Analizar las modificaciones inducidas por la denervación noradrenérgica periférica sobre la pubertad de la cobaya.
- Analizar la participación de la inervación noradrenérgica del ovario en los mecanismos que regulan la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario (lateralización).
- Estudiar los efectos del estímulo secuencial con gonadotropinas sobre la pubertad de la cobaya.
- <sup>1</sup> Los objetivos particulares están detallados al inicio de cada experimento.

## **Materiales y Métodos**

Se utilizaron cobayas de las cepas Hartley y Topeka, recién nacidas, de diez ó quince días de edad, mantenidas en ciclo de luz-oscuridad controlado (luces encendidas de 06.00 a 19.00 hs) con libre acceso a la madre hasta el destete (diez días) y posteriormente al agua y al alimento. El peso corporal y la apertura vaginal se registraron diariamente entre las 08:00 y las 10:00 hs.

En la cobaya adulta, el ciclo estral dura de dieciséis a veinte días. Durante trece a quince días la vagina está cerrada por una membrana (periodo de cierre vaginal) la cual desaparece durante tres a seis días (*fase de apertura vaginal*). El período de cierre vaginal corresponde al diestro y se caracteriza por concentraciones plasmáticas bajas de estrógenos y LH, mientras que las concentraciones de progesterona y de FSH son altas. La etapa de proestro-estro se inicia con la apertura de la membrana vaginal (fase pre y postovulatoria) durante el cual hay un aumento brusco en las concentraciones plasmáticas de la FSH y del estradiol, *seguido por el de la LH* (35). Basados en estas características, definimos los tiempos en que se realizaron las autopsias como fase folicular (24-48 hs después de la apertura vaginal) o fase luteal (nueve a once días después del cierre de la vagina)

### ***Procedimiento de autopsia***

Los animales fueron pesados y anestesiados con éter, se extrajo sangre por punción del ventrículo izquierdo y fueron sacrificados, por sobredosis de éter. A la autopsia se disecaron y pesaron en balanza de precisión los ovarios, el útero y las adrenales. La sangre se dejó coagular a 4°C, minutos se centrifugó durante quince minutos a 3000 rpm, se extrajo el suero que se guardó a -20°C hasta el momento en que se midieron las concentraciones de estradiol y progesterona por radioinmunoanálisis (RIA) de doble anticuerpo, siguiendo el protocolo aprobado por la OMS, con reactivos proporcionados por el programa OMS-INN.

### ***Análisis de la población folicular***

Los ovarios fueron fijados en líquido de Bouin, incluidos en parafina, cortados en forma seriada a 10 µm y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. El estudio de la población folicular se realizó en el ovario izquierdo y el derecho de tres animales por grupo experimental, tomados al azar. Con la ayuda de un ocular micrométrico se midieron el diámetro mayor y el perpendicular a éste, de todos los folículos presentes en un corte cada 100 µm. Con los diámetros medidos de cada folículo se calculó el diámetro

promedio para clasificarlos en las siguientes categorías: menores a 350  $\mu\text{m}$ , entre 350 y 600  $\mu\text{m}$  y mayores a 600  $\mu\text{m}$ . Los folículos se consideraron como atrésicos cuando presentaron alguna de las siguientes alteraciones:

- 1-Células de la granulosa con núcleos picnóticos.
- 2-Células de la granulosa descamadas en el antro folicular.
- 3-Engrosamiento de la teca.
- 4-Alteraciones del ovocito.

### ***Análisis Estadístico***

Los resultados obtenidos fueron analizados utilizando las siguientes pruebas: el pesos de los ovarios, del útero y de las adrenales, la concentración plasmática de estrógenos y progesterona y el diámetro folicular promedio, por la prueba de análisis de varianza, seguida de la prueba de Tukey. Las diferencias entre dos grupos por la prueba de  $t$  de Student. Las edades de apertura vaginal y el número de cuerpos lúteos por la prueba de Kruskal-Wallis. El porcentaje de ovulación, expresado por el número de animales con cuerpos lúteos jóvenes presentes en los ovarios, por la prueba de probabilidad exacta de Fisher. Los resultados de la distribución folicular por la prueba de  $\chi^2$ . Se aceptó como significativa una probabilidad igual o menor al 5%.

## Objetivo I

***Analizar los efectos de la denervación noradrenérgica periférica por la administración de guanetidina sobre la pubertad espontánea y las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona.***

Con el fin de analizar si la inervación simpática del ovario participa en la regulación del proceso de pubertad y de la esteroidogénesis, se evaluaron los efectos de la denervación farmacológica sobre la edad de la primera apertura vaginal y las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona. Para ello se realizaron los siguientes grupos experimentales:

1- Se utilizaron veintidós hembras como grupo testigo, sin tratamiento. Dieciséis fueron sacrificadas en la fase folicular y seis en la fase luteal.

2- Cuarenta y nueve animales fueron inyectados con guanetidina (Sigma Chem. Co, St. Louis, Mo. EE.UU.) disuelta en solución salina, a la dosis de 20 mg/K, por vía s/c, dos veces por semana, 26 a partir del primer día de vida y hasta la primera apertura vaginal, de los cuales doce fueron sacrificadas en la fase folicular y catorce en la fase luteal; veintidós cobayas fueron inyectadas a partir del día diez, de las cuales dieciséis se sacrificaron en la fase folicular y seis en la fase luteal. <sup>1</sup>

<sup>1</sup>Tres animales recién nacidos, fueron inyectados con tres dosis de guanetidina (20 mg/K) y se sacrificaron 24 hs después de la tercera administración, para medir la concentración de noradrenalina en el ovario por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC). Cuatro animales sin tratamiento se utilizaron como testigos. La concentración de NA en los ovarios de los animales testigo fue de  $0.95 \pm 0.1$  ng/mg de tejido, mientras que en los animales denervados con GTD la concentración estuvo por debajo del límite de detección del método utilizado (50pg).

## Resultados

La edad de la primera apertura vaginal de los animales denervados al nacimiento (GTD RN) o a los diez días de vida (GTD 10) se adelantó significativamente respecto a los testigos ( $27 \pm 1.2$  días en las tratadas al nacimiento y  $26 \pm 1.7$  días en las tratadas a los diez días vs.  $37 \pm 0.9$  en las testigo,  $p < 0.001$ ). La duración de la primera apertura vaginal en los animales denervados fue de  $14.6 \pm 0.7$  días vs.  $9.7 \pm 0.6$  en los testigos ( $p < 0.05$ ).

El peso corporal de los animales testigo sacrificados en la fase folicular fue menor que el de los sacrificados en la fase luteal. La masa ovárica no mostró diferencias significativas entre los animales sacrificados en alguna de las dos etapas, pero el peso relativo de los ovarios de los animales autopsiados en la fase luteal fue menor que el de los sacrificados en la fase folicular. La masa adrenal de los animales sacrificados en la fase luteal fue significativamente mayor que los sacrificados en la fase folicular, pero los pesos relativos fueron semejantes (Tabla 1).

Tabla 1. Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal y de los pesos absoluto (A) y relativo (R, mg/100g) de ovarios, útero y adrenales de cobayas testigo sacrificadas en la fase folicular (FF) o en la fase luteal (FL).

Fase	A/R	n	Peso corporal	Masa Ovárica	Útero	Masa Adrenal
FF	A	16	327 $\pm$ 6.0	68.3 $\pm$ 2.6	916 $\pm$ 59	103 $\pm$ 4.8
FL	A	6	448 $\pm$ 13*	75.4 $\pm$ 7.8	1068 $\pm$ 127	161 $\pm$ 5.1*
FF	R	16	327 $\pm$ 6.0	20.9 $\pm$ 0.8	292 $\pm$ 20	31.6 $\pm$ 1.5
FL	R	6	448 $\pm$ 13	16.8 $\pm$ 1.4*	242 $\pm$ 33	35.4 $\pm$ 2.2

\*  $p < 0.05$  comparado con la FF (Prueba de "t" de Student).

El peso corporal de los animales tratados con guanetidina, sacrificados en la fase folicular fue significativamente menor que el de los animales testigo, y no se observaron diferencias significativas cuando los animales fueron sacrificados en la fase luteal (Tabla 2). El peso absoluto de los ovarios y las adrenales de los animales denervados fue similar al de los grupos testigo, mientras que el peso relativo de ambos órganos fue mayor que el de los testigos en los animales autopsiados en la fase folicular. Cuando las autopsias se realizaron en la fase luteal, sólo se encontraron diferencias significativas en el peso relativo de los ovarios de las cobayas denervadas desde el nacimiento. Cuando los animales fueron sacrificados en la fase folicular, el peso absoluto y relativo del útero de los animales denervados desde el nacimiento o a partir del día diez fue significativamente menor que en los animales testigo. En aquellos sacrificados en la fase luteal, las diferencias observadas no alcanzan valores significativos debido a la gran dispersión de los resultados (Tabla 2).

Tabla 2. Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal, y del peso absoluto (A) y relativo (R) de los ovarios, útero y adrenales de cobayas testigo y tratadas con guanetidina (GTD) a partir del nacimiento o del día 10, sacrificadas en la fase folicular (FF) o en la fase luteal (FL).

### Fase folicular

Grupo	A/R	n	Peso corporal	Masa Ovárica	Útero	Masa Adrenal
Testigo	A	16	327 $\pm$ 6.0	68.3 $\pm$ 2.6	916 $\pm$ 59	103 $\pm$ 4.8
GTD RN	A	12	261 $\pm$ 8.5*	75.5 $\pm$ 3.6	474 $\pm$ 46*	92 $\pm$ 4.1
GTD 10	A	16	246 $\pm$ 16*	69.0 $\pm$ 4.1	371 $\pm$ 76*	92 $\pm$ 4.9
Testigo	R	-		20.9 $\pm$ 0.8	292 $\pm$ 20	31.6 $\pm$ 1.5
GTD RN	R	-		27.8 $\pm$ 1.3*	179 $\pm$ 13*	36.4 $\pm$ 1.4*
GTD 10	R	-		28.9 $\pm$ 3.0*	149 $\pm$ 28*	37.0 $\pm$ 0.8*

### Fase luteal

Testigo	A	6	448 $\pm$ 13	75.4 $\pm$ 7.8	1068 $\pm$ 127	161 $\pm$ 5.1
GTD RN	A	14	405 $\pm$ 14	78.0 $\pm$ 4.9	795 $\pm$ 37	173 $\pm$ 6.5
GTD 10	A	6	421 $\pm$ 6	83.5 $\pm$ 8.5	853 $\pm$ 52	153 $\pm$ 5.1
Testigo	R	-		16.8 $\pm$ 1.4	242 $\pm$ 33	35.4 $\pm$ 2.2
GTD RN	R	-		21.4 $\pm$ 1.7*	199 $\pm$ 24	40.3 $\pm$ 2.0
GTD 10	R	-		20.6 $\pm$ 1.7	195 $\pm$ 14	39.5 $\pm$ 1.8

\*  $p < 0.05$  vs. grupo testigo correspondiente (Prueba de la  $t$  de Student).

La concentración plasmática de estradiol fuè similar en las cobayas testigo y denervadas al nacimiento sacrificadas en la fase folicular. En cambio, la concentración de estrógenos de los animales denervados a partir del nacimiento y sacrificados en la fase luteal fue significativamente mayor que la de los animales testigo y denervados a partir del día diez (Tabla 3, Gráfica 1).

Tabla 3. Media  $\pm$  e.e.m. de las concentraciones de estradiol en plasma (pg/ml) y de progesterona (ng/ml) de cobayas testigo y tratadas con guanetidina a partir del nacimiento (GTDRN) ó del día 10, (GTD10) y sacrificadas en la fase folicular o luteal.

### Fase folicular

Grupo	n	Estradiol	Progesterona
Testigo	3	94.39 $\pm$ 4.9	0.33 $\pm$ 0.19
GTD RN	3	82.33 $\pm$ 7.8	1.47 $\pm$ 0.02*
GTD 10		No Determinado	No Determinado

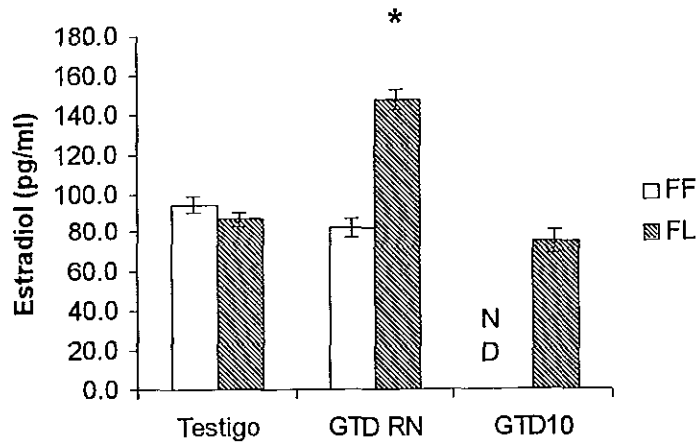
### Fase luteal

Grupo	n	Estradiol	Progesterona
Testigo	5	86.93 $\pm$ 9.79	1.63 $\pm$ 0.42
GTD RN	5	147.52 $\pm$ 10.54*	0.59 $\pm$ 0.12*
GTD 10 DIAS	9	75.80 $\pm$ 12.33	0.76 $\pm$ 0.39*

\* $p < 0.01$  vs. testigo (ANDEVA seguido de la prueba de Tukey).



Gráfico 1. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de estradiol en plasma (pg/ml) de cobayas testigo y denervadas desde el nacimiento o de los 10 días, sacrificadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL)

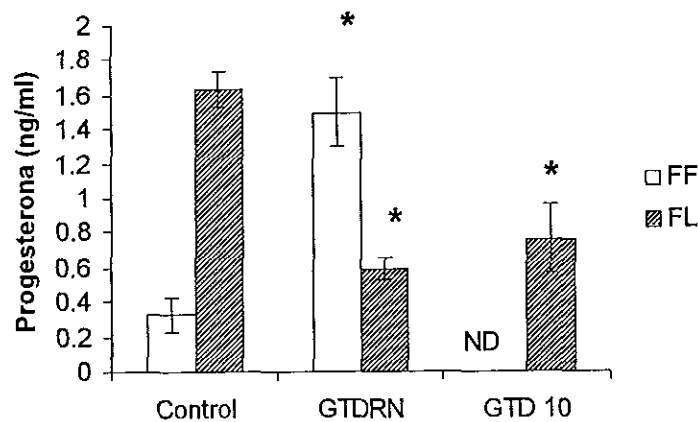


ND: no determinado.

\*  $p < 0.05$  vs. grupo testigo en la fase luteal (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

En los animales denervados a partir del nacimiento y sacrificados en la fase folicular, la concentración plasmática de progesterona fue significativamente mayor que la del grupo testigo. No se tienen los datos de los animales denervados a partir del día diez. En cambio, en los animales sacrificados en la fase luteal, las concentraciones de progesterona son significativamente menores en los animales denervados que en los testigos (Gráfico 2).

Gráfico 2. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de progesterona en plasma (ng/ml) de cobayas controles y denervadas desde el día del nacimiento o 10 de vida, autopsiadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).



ND: no determinado

\*  $p < 0.05$  vs. grupo testigo en las fases folicular o luteal. (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

## Objetivo II

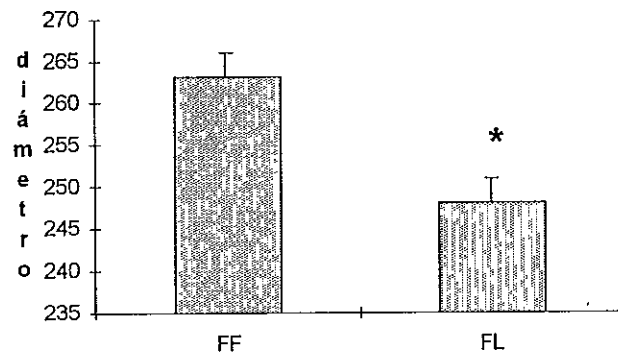
*Analizar los efectos de la denervación noradrenérgica periférica sobre el compartimiento folicular y la ovulación.*

Con el fin de analizar si la inervación simpática del ovario participa en el control del desarrollo folicular, se estudiaron los efectos de la denervación farmacológica sobre la distribución de la población folicular y la primera ovulación.

El estudio histológico de los ovarios de los animales testigo y denervados con GTD, mostró la presencia de cuerpos lúteos sólo en las cobayas autopsiadas en la fase luteal. El número de cuerpos lúteos fue similar en los tres grupos:  $3.3 \pm 0.3$  para los testigo vs.  $3.5 \pm 0.2$  para los tratados con GTD al nacimiento y  $3.4 \pm 0.3$  para los denervados a partir de los diez días. El número total de folículos presentes en los ovarios de los animales denervados fue mayor que el de los animales testigo:  $1736 \pm 230$  vs.  $969 \pm 147$ ,  $p < 0.05$ .

El diámetro promedio de los folículos de los ovarios testigo de las cobayas sacrificadas en la fase folicular fue significativamente mayor que el observado en la fase luteal (Gráfica 3).

Gráfica 3- Diámetro folicular promedio ( $\mu\text{m}$ ) medido en el ovario de cobayas testigo sacrificadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).

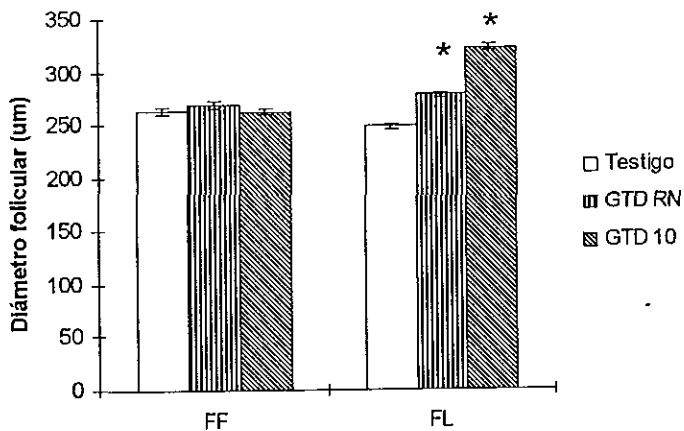


\* $p < 0.01$  vs. FF (Prueba de  $t$  de Student).

El diámetro promedio de los folículos medidos en los ovarios de los animales denervados fue significativamente mayor que el de los testigo (GTD RN:  $274 \pm 2.0 \mu\text{m}$  vs.  $255 \pm 2.4 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ; GTD 10:  $286 \pm 2.3 \mu\text{m}$  vs.  $257 \pm 2.3 \mu\text{m}$ ,  $p < 0.05$ ). Cuando el análisis se realizó considerando la etapa del ciclo

estral en la cual se sacrificaron los animales, se encontraron diferencias significativas solamente en los ovarios de las cobayas autopsiadas en la fase luteal (Gráfica 4).

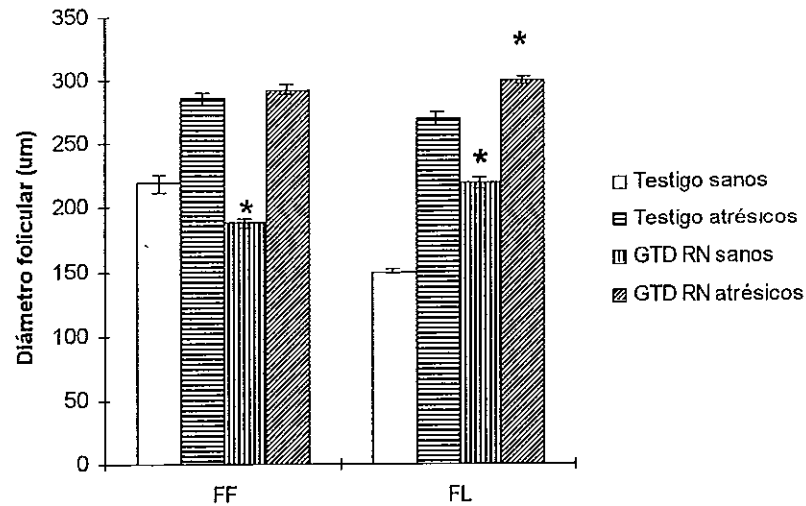
Gráfica 4- Diámetro folicular promedio ( $\mu\text{m}$ ) medido en el ovario de cobayas testigo y denervadas desde el día del nacimiento o el día 10 de vida, sacrificadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).



\* $p < 0.01$  vs. grupo testigo (ANDEVA seguido de Tukey).

El diámetro folicular promedio de los folículos sanos o atresicos presentó diferencias significativas que dependieron de la edad de inicio del tratamiento y de la fase del ciclo estral en la cual se sacrificaron los animales. Cuando las cobayas fueron tratadas con GTD a partir del primer día de vida y autopsiadas en la fase folicular, el diámetro promedio de los folículos sanos, fue menor que el de las testigo, en tanto que el diámetro promedio de los folículos atresicos no presentó diferencias significativas (Gráfica 5). En los animales tratados con GTD desde el nacimiento, autopsiados en la fase luteal, el diámetro promedio tanto de los folículos sanos como de los atresicos, fue mayor que el de los testigo (Gráfica 5).

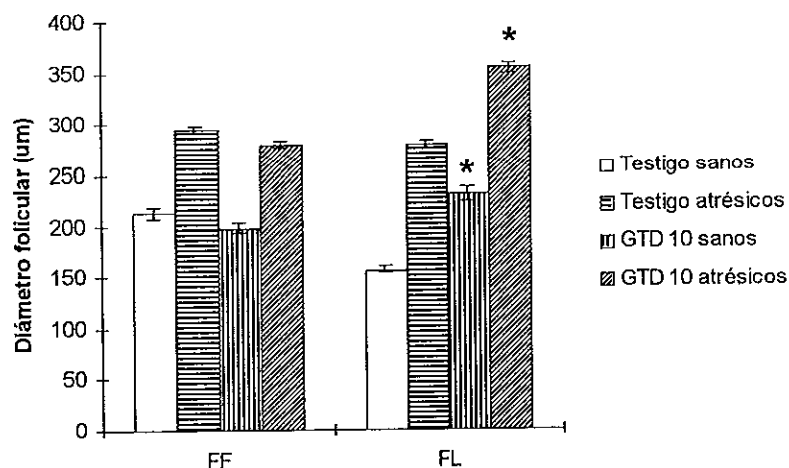
Gráfica 5. Diámetro folicular promedio de los folículos sanos y atrésicos en el ovario de cobayas testigos y denervadas a partir del día del nacimiento y sacrificadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).



\* $p < 0.01$  vs. grupo testigo correspondiente (ANDEVA seguido de Tukey).

En el grupo de animales denervados a partir de los diez días de vida y sacrificados en la fase folicular, no se encontraron diferencias significativas en los diámetros promedio de los folículos sanos ni atrésicos (Gráfica 6). Por el contrario, cuando las cobayas se autopsiaron en la fase luteal, el diámetro promedio de los folículos sanos y atrésicos, fue significativamente mayor que el de los testigos (Gráfica 6).

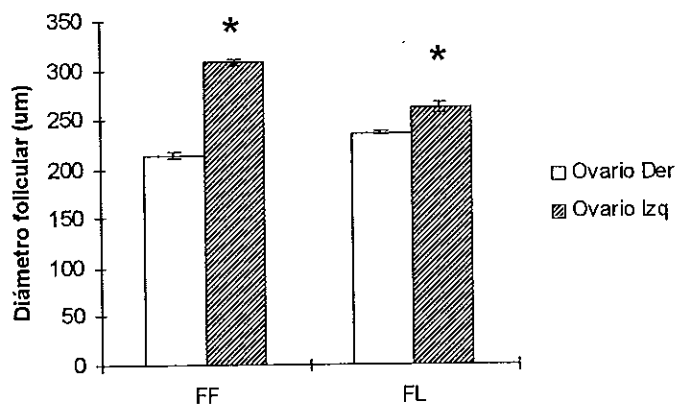
Gráfica 6. Diámetro folicular promedio ( $\mu\text{m}$ ) de los folículos sanos y atrésicos medidos en los ovarios de cobayas testigo y denervadas a partir del día 10, autopsiadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).



\* $p < 0.01$  vs. grupo testigo correspondiente (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Cuando se compararon los diámetros foliculares promedio de los ovarios derecho e izquierdo de las cobayas testigo, este último presentó valores significativamente más altos en ambas etapas del ciclo estral (Gráfica 7).

Gráfica 7. Diámetro folicular promedio ( $\mu\text{m}$ ) de los ovarios derecho e izquierdo de cobayas testigo, autopsiadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).

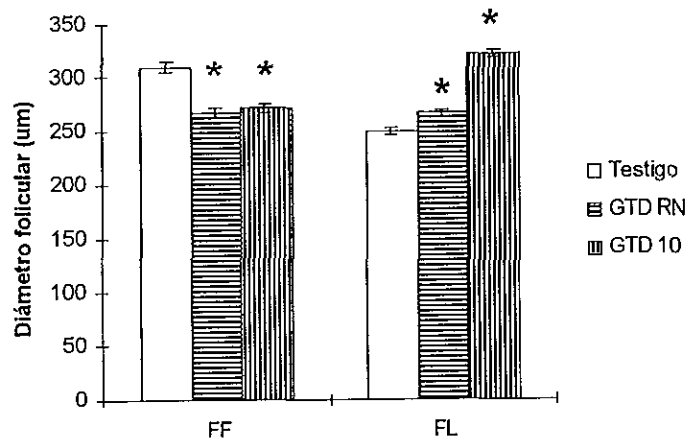


\* $p < 0.01$  vs. fase folicular (Prueba de "t" de Student).

En respuesta a la denervación noradrenérgica el crecimiento folicular en el ovario derecho fue distinto al del izquierdo. En el ovario izquierdo de los animales denervados a partir del nacimiento o del día diez y sacrificados en la fase folicular, el diámetro folicular promedio fue menor en relación al testigo. Cuando los animales denervados se sacrificaron en la fase luteal, el diámetro folicular promedio fue mayor

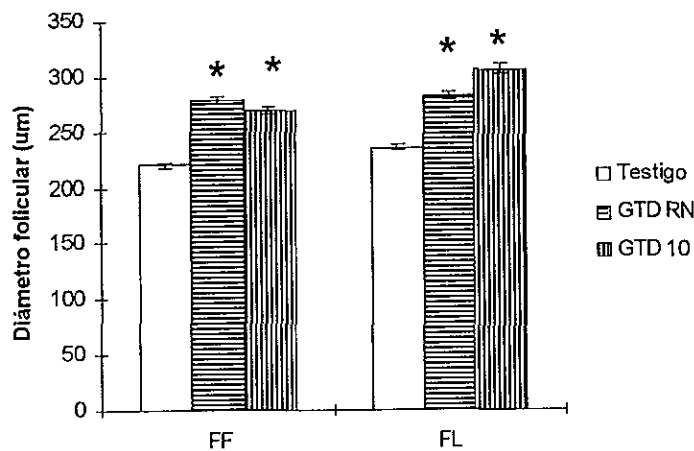
que en el grupo testigo. (Gráfica 8). En el ovario derecho de los animales denervados, el diámetro folicular promedio siempre fue mayor que el de los testigos, independientemente de la edad de inicio del tratamiento con GTD y de la etapa del ciclo en la cual fueron sacrificados. (Gráfica 9).

Gráfica 8. Diámetro folicular promedio ( $\mu\text{m}$ ) medido en el ovario izquierdo de cobayas testigo, denervadas desde el día del nacimiento o 10 de vida, sacrificadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL)



\* $p < 0.05$  vs. testigo (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Gráfica 9. Diámetro folicular promedio ( $\mu\text{m}$ ) medido en el ovario derecho de cobayas testigo y denervadas a partir del día del nacimiento o del día 10 de vida, sacrificadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).

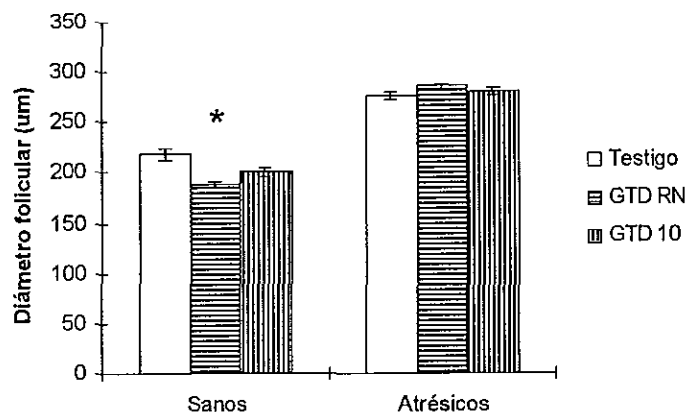


\* $p < 0.01$  vs. testigo (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

El análisis de la distribución folicular clasificada por diámetro, no mostró diferencias significativas en el número ni en el porcentaje de folículos atrésicos y sanos entre los animales denervados y testigo. Al realizar este análisis dependiendo de la fase del ciclo estral en la que se autopsiaron a los animales, se encontró que el diámetro de los folículos sanos está disminuido en el animal denervado desde el

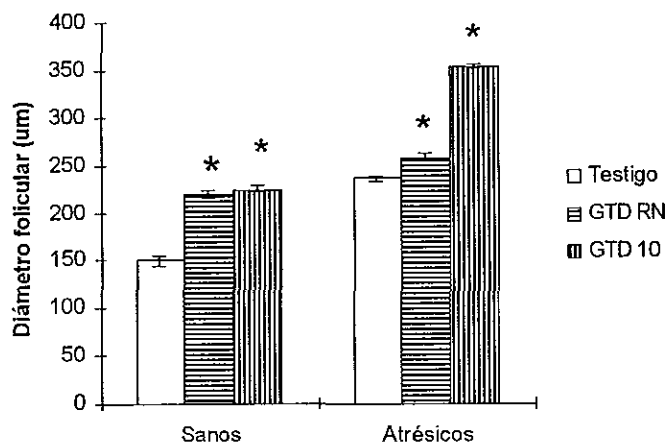
nacimiento sin cambios en los atrésicos. No se encontraron modificaciones respecto al testigo en los diámetros foliculares de los ovarios denervados a partir de los diez días. Cuando las autopsias se realizaron en la fase luteal, se observó un aumento en el diámetro de los folículos tanto sanos como atrésicos de los animales denervados, independientemente de la edad de inicio del tratamiento (Gráficas 10 y 11).

Gráfica 10. Diámetro folicular ( $\mu\text{m}$ ) de folículos sanos y atrésicos medidos en los ovarios de cobayas testigos y denervadas a partir del nacimiento o del día 10 de vida, sacrificadas en la fase folicular.



\* $p < 0.05$  vs. grupo testigo (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Gráfico 11. Diámetro promedio ( $\mu\text{m}$ ) de folículos sanos y atrésicos medidos en los ovarios de cobayas testigo y denervadas desde el día del nacimiento o 10 de vida, sacrificadas en la fase luteal (FL).



\* $p < 0.05$  vs. Testigo (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Cuando los folículos fueron clasificados según su diámetro en mayores o menores de  $600 \mu\text{m}$ , se observó que el número total y el relativo (por ciento) de folículos con diámetro mayor de  $600 \mu\text{m}$  fue

significativamente mayor en los ovarios de los animales denervados, independientemente de la edad de inicio del tratamiento y de la etapa del ciclo en la que se realizaron las autopsias (fase folicular: 3.17% vs. 1.86%; fase luteal: 3.78 % vs. 1.65%,  $P < 0.05$ , prueba de Ji<sup>2</sup>). En estos folículos, el índice de atresia fue significativamente mayor en los animales denervados que en los testigo (fase folicular: 3.12% vs. 1.15%; fase luteal: 3.02% vs. 1.91%,  $P < 0.05$ , prueba de Ji<sup>2</sup>). No se encontraron diferencias significativas en el porcentaje de folículos sanos y atrésicos, clasificados por su diámetro entre los grupos testigo y denervados sacrificados en la fase folicular. Cuando los animales fueron sacrificados en la fase luteal el porcentaje de folículos sanos menores a las 350  $\mu\text{m}$  fue similar entre los tres grupos, pero aumentó en los de diámetro entre 350-600  $\mu\text{m}$ : 0.6% para los testigos vs 6% para los denervados a partir del nacimiento y 10% para los denervados a los diez días ( $P < 0.01$  prueba de Ji<sup>2</sup>). No se encontraron folículos sanos con diámetro mayor a las 600  $\mu\text{m}$  en los ovarios de los animales testigo, en tanto que en los denervados el porcentaje de folículos sanos fue de 21% para los denervados desde el nacimiento y 20% para los denervados a los diez días

## **DISCUSIÓN**

El adelanto en la edad de la primera apertura vaginal en los animales denervados con GTD se acompañó de una ovulación precoz. En tanto que la apertura vaginal refleja una secreción de estrógenos adelantada por parte de los ovarios, la ovulación nos permite plantear que los animales denervados tuvieron una pubertad precoz completa. Este resultado concuerda con la observación de Ross (157) de que "las hormonas esteroideas median algunos de los efectos de las gonadotropinas sobre el desarrollo y la diferenciación de los folículos preovulatorios," porque los estrógenos inducen la aparición de receptores a la hormona luteinizante (155) y ésta, la actividad aromatasa en las células de la granulosa (43).

En términos generales se acepta que los folículos sanos más grandes, producen las mayores cantidades de estrógenos (81). Como el número de folículos sanos de diámetro mayor a las 600  $\mu\text{m}$ , es mayor en los ovarios de las cobayas denervadas respecto a las testigo, el número de unidades secretoras de estrógenos también está aumentada. Este incremento se traduciría en la apertura vaginal adelantada y probablemente en su mayor duración y es corroborado por los valores más altos de estradiol sérico encontrados en los animales denervados a partir del nacimiento. No podemos descartar una mayor sensibilidad de la vagina denervada a los estrógenos.

El aumento en la incidencia de folículos atrésicos con diámetro mayor a 600  $\mu\text{m}$  no podría explicarse por una disminución de la actividad aromatasa en los folículos, sino quizás por un aumento local de las concentraciones de andrógenos perifoliculares. Existen evidencias de que la noradrenalina actúa de manera sinérgica con la LH sobre la estimulación de la secreción de andrógenos (59) y según Greenwald



y Roy (81), la disminución en la secreción de estrógenos por los folículos atrésicos es atribuible a una caída en la secreción de andrógenos. Dado que ambas explicaciones se contradicen, probablemente el aumento en el número de folículos atrésicos en los ovarios de las cobayas denervadas, refleje la modificación de otros factores que regulan la atresia, como puede ser la irrigación tecal (80).

Aunque Mills y Reed (121) consideran la existencia de una "etapa crítica" previa al primer estro de la cobaya, durante el cual el ovario puede ovular en respuesta a la administración de gonadotropinas exógenas, Curry y cols (39) y Riboni y cols (153) mostraron que la administración secuencial de PMSG seguida por hCG a cobayas de diez ó 25 días de edad, denervadas o no, resultó en una ovulación adelantada medida por la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios.

Considerados en su conjunto, nuestros resultados permiten sugerir que la inervación ovárica juega un papel inhibitorio en el desarrollo, la maduración y la atresia folicular, que no parecen estar vinculados a la secreción esteroidea del ovario. Estos mecanismos regulatorios presentan diferencias entre el ovario derecho y el izquierdo, por lo cual, posiblemente la información neural que reciben pueda provenir de lados diferentes del SNC, como ha sido postulado en la rata (13, 38, 49)

### Objetivo III

***Analizar los efectos de la hemicastración en cobayas con denervación noradrenérgica periférica inducida por la administración de guanetidina, sobre la pubertad, la primera ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario.***

Dado que en el animal entero se encontraron diferencias en la respuesta a la denervación farmacológica entre el ovario derecho y el izquierdo, se analizaron los efectos de la hemicastración sobre el proceso de hipertrofia compensadora y si ésta es modificada por la denervación del ovario *"in situ"*.

Se utilizaron 67 cobayas de diez días de edad. Veintitrés animales se dejaron como testigos absolutos y 44 fueron hemicastradas del ovario derecho o del izquierdo. Once se sacrificaron en la fase folicular y doce en la fase luteal. Veintiuno de estos animales fueron tratados con GTD a partir de las 24 hs siguientes a la cirugía. Doce se sacrificaron en la fase folicular y trece en la fase luteal. Los resultados fueron comparados con el grupo de animales testigo absoluto. El porcentaje de hipertrofia compensadora (HCO) se calculó de la siguiente manera:

$$\text{HCO} = \frac{\text{peso del ovario in situ} - \text{media del peso del mismo ovario del testigo}}{\text{media del peso del mismo ovario del testigo}} \times 100$$

### Resultados

#### ***A- Efectos de la hemicastración derecha***

En comparación con el grupo testigo absoluto, no se observaron diferencias significativas en la edad de la primera apertura vaginal, ni en el peso de las adrenales y del útero. La hipertrofia compensadora del ovario izquierdo fue del  $41.5\% \pm 5.2$  (fase folicular) y de  $45.9\% \pm 7.2$  (fase luteal).

La concentraciones plasmáticas de estradiol y de progesterona sólo se midieron en los animales sacrificados en la fase folicular. Estradiol:  $79.20 \pm 9.02$  vs  $94.39 \pm 5.0$  pg/ml en los testigos. Progesterona:  $0.82 \pm 0.04$  vs  $0.33 \pm 0.2$  ng/ml en los testigos ( $p < 0.05$ )

### B- Efectos de la hemicastración izquierda

En comparación con el grupo testigo, no se observaron diferencias significativas en la edad de la primera apertura vaginal, ni en el peso del útero. El peso relativo de las adrenales sacrificados en la fase folicular fue mayor en los animales hemicastrados que en el grupo testigo:  $36.4 \pm 2.1$  vs.  $30.2 \pm 1.6$  ( $p < 0.05$ ). Cuando los animales se sacrificaron en la fase luteal, el peso relativo de las adrenales fue menor que en los animales controles:  $28.5 \pm 1.5$  vs  $35.4 \pm 2.2$  ( $p < 0.05$ ). La hipertrofia compensadora del ovario derecho fue del  $27.5\% \pm 5.6$  (fase folicular) y  $43.4\% \pm 12.9$  (fase luteal)(Tabla 4).

La concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona sólo se midieron en los animales sacrificados en la fase folicular. Estradiol:  $64.15 \pm 4.23$  vs  $94.39 \pm 5.0$  pg/ml en los testigos.

Progesterona:  $0.61 \pm 0.10$  vs  $0.33 \pm 0.2$  ng/ml en los testigos

( $p < 0.05$ ).

Tabla 4- Media  $\pm$  e.e.m. de los pesos corporales, edad de apertura vaginal, pesos absolutos (A) o relativos (mg/100 gr) (R) de los ovarios y del útero y porciento de hipertrofia compensadora del ovario en cobayas testigo y hemicastradas del ovario derecho o del izquierdo y sacrificadas el día de la primera apertura vaginal.

#### Fase folicular

Grupo	N	A/R	Ovario derecho	Ovario izquierdo	% H.C.	Utero	E.A.V.	Peso corporal
Testigo	11	A	$34.2 \pm 1.9$	$36.6 \pm 1.7$		$921.2 \pm 78.9$		$300.6 \pm 28.1$
Hem. D	5	A		$48.5 \pm 1.5$	$41.4 \pm 4.4$	$743 \pm 94$		$324.4 \pm 6.8$
Hem. I	5	A	$43.2 \pm 1.7$		$27 \pm 5$	$1183 \pm 194$		$330.6 \pm 96$
Testigo	11	R	$10.5 \pm 0.5$	$11.3 \pm 0.5$		$296 \pm 24$	$37 \pm 0.9$	
Hem. D	5	R		$15.5 \pm 0.5^{**}$	$41.5 \pm 5.2$	$229 \pm 28$	$37 \pm 1$	
Hem. I	5	R	$13.1 \pm 0.6^*$		$27.5 \pm 5.6^*$	$298 \pm 25$	$34 \pm 1$	

\* $p < 0.02$  y \*\* $p < 0.001$  vs hemicastradas. (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

#### Fase luteal

Grupo	N	A/R	Ovario derecho	Ovario izquierdo	% H.C.	Utero	E.A.V.	Peso corporal
Testigo	11	A	$38.6 \pm 2.9$	$36.8 \pm 3.9$		$1067.8 \pm 127.4$		$448 \pm 12.5$
Hem. D	6	A		$53.6 \pm 2$	$45.8 \pm 5.4$	$669 \pm 43.8$		$452.2 \pm 22.4$
Hem. I	6	A	$51.8 \pm 4.5$		$34.2 \pm 11.6$	$805.2 \pm 128.6$		$422.3 \pm 18.5$
Testigo	11	R	$8.6 \pm 0.5$	$8.2 \pm 0.8$		$242 \pm 32.8$	$37 \pm 0.9$	
Hem. D	6	R		$11.9 \pm 0.6^{**}$	$45.9 \pm 7.2$	$156.3 \pm 11.3^*$	$37 \pm 1$	
Hem. I	6	R	$12.3 \pm 1.1^{**}$		$43.4 \pm 13$	$193.8 \pm 35.5$	$34 \pm 1$	

\* $p < 0.02$  y \*\* $p < 0.001$  respecto a hemicastradas. (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

**C- Efectos de la denervación inducida por la administración de guanetidina en la cobaya con hemicastración derecha**

En comparación con el grupo testigo absoluto y con los animales hemicastrados, no se observaron diferencias significativas en la edad de la primera apertura vaginal. El peso relativo del ovario izquierdo (*"in situ"*) y el grado de hipertrofia compensadora del ovario de los animales hemicastrados y denervados fue mayor que en los solamente hemicastrados: El peso del útero de los animales denervados fue significativamente menor que el de los hemicastrados (Tabla 5).

Tabla 5. Media  $\pm$  e.e.m. de pesos corporales, edad de apertura vaginal, pesos absolutos (A) o relativos (R) (mg/100 gr) del ovario izquierdo y del útero, porcentaje de hipertrofia compensadora del ovario en cobayas testigo, hemicastradas del ovario derecho y tratadas con GTD.

**Fase folicular**

Grupo	N	A/R	Ovario I.	% H.C.	Útero	EAV	Peso corporal
Hem. D	5	A	48.5 $\pm$ 1.5	41.4 $\pm$ 4.4	743 $\pm$ 94		324.4 $\pm$ 6.8
Hem D+GTD	6	A	52 $\pm$ 5.1	51.8 $\pm$ 15	400.7 $\pm$ 30		277.6 $\pm$ 20.1
Hem. D.	5	R	15.5 $\pm$ 0.5	41.5 $\pm$ 5.2	229 $\pm$ 28	37 $\pm$ 1	
Hem D+GTD	6	R	18.8 $\pm$ 1.3	79 $\pm$ 13*	146 $\pm$ 6.8*	36 $\pm$ 2	

\*p<0.05 vs. hemicastradas. (Prueba de "t" de Student).

**Fase luteal**

Grupo	N	A/R	Ovario I.	% H.C.	Útero	EAV	Peso corporal
Hem. D	6	A	53.6 $\pm$ 2	45.8 $\pm$ 5.4	699 $\pm$ 43.8		451.2 $\pm$ 22.4
Hem. D+GTD	5	A	46 $\pm$ 5.8	24.7 $\pm$ 16	843.1 $\pm$ 55		462.6 $\pm$ 21.5
Hem D	6	R	11.9 $\pm$ 0.6	45.9 $\pm$ 7.2	156.3 $\pm$ 11.3	37 $\pm$ 1	
Hem.D+GTD	5	R	10.1 $\pm$ 1.5	30.7 $\pm$ 13	183.7 $\pm$ 14.3	36 $\pm$ 2	

**D- Efectos de la denervación inducida por la administración de guanetidina en la cobaya con hemicastración izquierda**

En comparación con el grupo testigo absoluto y con los hemicastrados en los animales denervados, la edad de la primera apertura vaginal se adelantó de manera significativa. Al igual que en los animales hemicastrados del ovario derecho, el peso del ovario *"in situ"*, el grado de hipertrofia compensadora y el peso uterino no alcanzan a ser significativos por la gran dispersión de los datos. (Tabla 6)

Tabla 6. Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal, edad de apertura vaginal, pesos absolutos (A) y relativos (R) (mg/100 gr) de los ovarios y del útero y porcentaje de hipertrofia compensadora del ovario en cobayas hemicastradas del ovario izquierdo y tratadas con GTD.

### Fase folicular

Grupo	N	A/R	Ovario D	% H.C.	Utero	EAV	Peso corporal
Hem I	5	A	43.2 $\pm$ 1.7	27 $\pm$ 5	1182.9 $\pm$ 194		330.6 $\pm$ 96
Hem I+GTD	6	A	47.1 $\pm$ 4.6	38.6 $\pm$ 13	627.1 $\pm$ 157.4		286.4 $\pm$ 20.5
Hem I	5	R	13.1 $\pm$ 0.6	27.5 $\pm$ 5.6	298 $\pm$ 25	34 $\pm$ 1	
Hem I+ GTD	6	R	17 $\pm$ 2.6*	66 $\pm$ 24	211 $\pm$ 42	31 $\pm$ 0.7	

\*p<0.05 vs. Hemicastradas (Prueba de "t" de Student).

### Fase luteal

Grupo	N	A/R	Ovario D	% H.C.	Utero	EAV	Peso corporal
Hem I	6	A	51.8 $\pm$ 4.5	34.2 $\pm$ 11	805.2 $\pm$ 128.6		422.3 $\pm$ 18.5
Hem I+GTD	5	A	46.9 $\pm$ 3.9	25.5 $\pm$ 9.0	680.1 $\pm$ 70.3		436.8 $\pm$ 12.5
Hem I	6	R	12.3 $\pm$ 1.1	43.4 $\pm$ 12	193.8 $\pm$ 35.5	34 $\pm$ 1	
Hem I+ GTD	5	R	10.3 $\pm$ 0.9	21 $\pm$ 11	142.6 $\pm$ 13.8	31 $\pm$ 0.7	

\*p<0.05 vs. hemicastradas (Prueba de "t" de Student)

## Objetivo IV

**Analizar los efectos de la hemicastración y autoinjerto de ovario en cobayas con denervación noradrenérgica periférica inducida por la administración de guanetidina, sobre la pubertad, la primera ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario.**

Con base en los resultados publicados previamente (12, 49), para analizar si la presencia del ovario extirpado autoinjertado en el tejido celular subcutáneo modifica la edad de la pubertad, la hipertrofia compensadora del ovario remanente y si la denervación farmacológica de éste altera estos resultados, se realizó el siguiente experimento.

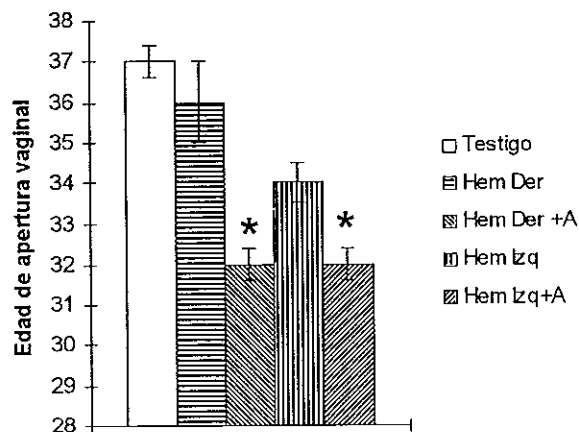
Cuarenta y siete cobayas de diez días de edad fueron hemicastradas del ovario derecho o izquierdo y en el mismo acto quirúrgico, el ovario extirpado fue autoinjertado en el tejido celular subcutáneo del dorso. Veintidós de estos animales fueron tratados con GTD, a partir de las 24 hs siguientes a la cirugía.

## Resultados

### A- Efectos de la hemicastración derecha o izquierda en cobayas con autoinjerto del ovario

En comparación con los animales testigo absoluto y hemicastrados, la edad de la primera apertura vaginal se adelantó de manera significativa (Gráfica 12).

Gráfica 12. Media  $\pm$  e.e.m de las edades de edad de apertura vaginal de cobayas testigo, hemicastradas del ovario derecho e izquierdo y con autoinjerto del ovario extirpado.



\* $p < 0.01$  vs. grupo testigo (Prueba de Kruskal-Wallis).

La presencia del autoinjerto no resultó en modificaciones del porcentaje de hipertrofia compensadora del ovario *in situ*, ni del peso de los otros órganos endócrinos (Tabla 7).

Tabla 7- Media  $\pm$  e.e.m. de los pesos corporales, edad de apertura vaginal y pesos absolutos (A) y relativos (R) (mg/100 gr) de ovarios y útero y % de hipertrofia compensadora del ovario de cobayas hemicastradas del ovario derecho y hemicastradas con autoinjerto.

### Fase folicular

Grupo	N	Ovario D.	Ovario I.	% H.C.	Útero	EAV	Peso corporal
Hem. D	5		15.5 $\pm$ 0.5	41 $\pm$ 5.2	229 $\pm$ 28	37 $\pm$ 1	324.4 $\pm$ 6.8
Hem. D+A	6		15.4 $\pm$ 2.1	46 $\pm$ 20	284 $\pm$ 11	32 $\pm$ 0.8**	298.2 $\pm$ 13.2
Hem. I	5	13.1 $\pm$ 0.6		27 $\pm$ 5.6	298 $\pm$ 25	34 $\pm$ 1	330.6 $\pm$ 9.6
Hem. I+A	6	13.7 $\pm$ 0.7		21 $\pm$ 6.1	266 $\pm$ 19	32 $\pm$ 0.9	301 $\pm$ 8.3

\*p<0.02 vs. hemicastradas (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

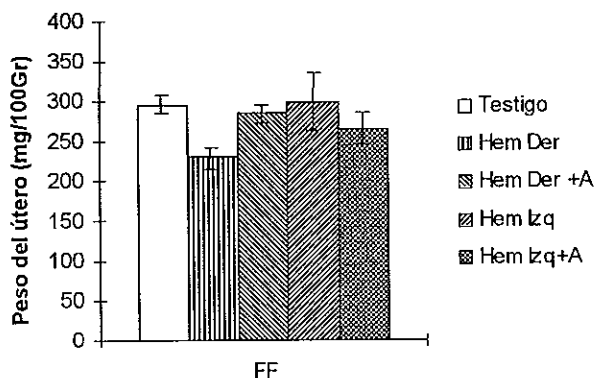
### Fase luteal

Grupo	N	Ovario D.	Ovario I.	% H.C.	Útero	EAV	Peso corporal
Hem. D	6		11.9 $\pm$ 0.6	45.9 $\pm$ 7.2	156.5 $\pm$ 11.8	37 $\pm$ 1	452.2 $\pm$ 22.4
Hem. D+A	7		14.5 $\pm$ 3.4	30.7 $\pm$ 13	168.9 $\pm$ 8.8	32 $\pm$ 0.8**	469.3 $\pm$ 24.6
Hem. I	6	12.3 $\pm$ 1.1		27.5 $\pm$ 5.6	193.8 $\pm$ 35.5	34 $\pm$ 1.	422.3 $\pm$ 18.5
Hem. I+A	6	13.7 $\pm$ 0.7*		59.3 $\pm$ 8.3*	202.5 $\pm$ 37.1	32 $\pm$ 0.9	412.8 $\pm$ 8.3

\*p<0.02 y \*\*p<0.001 respecto a hemicastradas (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

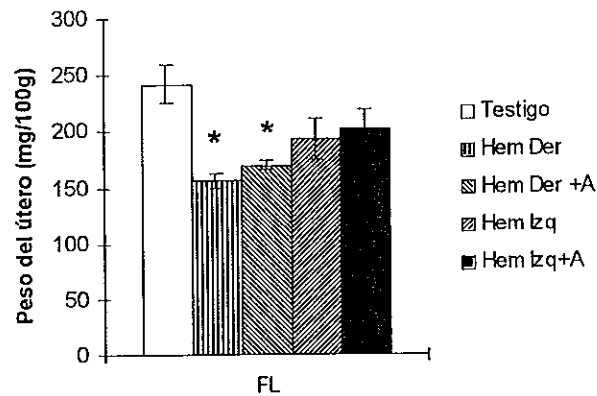
Los pesos uterinos fueron menores que en los animales controles sólo en los grupos de animales hemicastrados del ovario derecho sacrificados en la fase luteal (Gráficas 13 y 14).

Gráfica 13. Media  $\pm$  e.e.m. del peso uterino ( mg/100g ) de cobayas testigo, hemicastradas con autoinjerto del ovario extirpado, sacrificadas en la fase folicular ( FF ).



\*p<0.05 vs. testigo (Prueba de "t" de Student).

Gráfica 14. Media  $\pm$  e.e.m. del peso uterino (mg/100g) de cobayas testigo, hemicastradas con autoinjerto del ovario extirpado, sacrificadas en la fase luteal (FL).



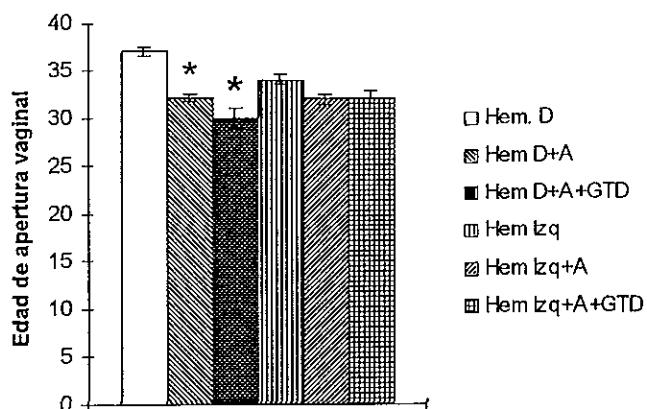
\* $p < 0.05$  vs. testigo (Prueba de "t" de Student).

### ***B- Efectos de la denervación noradrenérgica periférica en cobayas con hemicastración derecha o izquierda, y autoinjerto del ovario extirpado***

En comparación con los animales testigo absoluto y hemicastrados, en los grupos de hemicastrados con autoinjerto, denervados o no, la edad de la primera apertura vaginal se adelantó de manera significativa. No se observaron diferencias significativas en la edad de apertura vaginal entre estos dos últimos grupos (Gráfica 15).



Gráfica 15. Media  $\pm$  e.e.m. de las edades de la primera apertura vaginal en cobayas hemicastradas, hemicastradas con autoinjerto del ovario y hemicastradas, autoinjertadas y tratadas con GTD.



\* $p < 0.01$  vs. hemicastradas (Prueba de Kruskal-Wallis).

En comparación con los animales hemicastrados y autoinjertados, la denervación no modificó de manera significativa los parámetros estudiados (Tabla 8)

Tabla 8- Media  $\pm$  e.e.m. de ovarios y útero (mg/100 gr) y % de hipertrofia compensadora del ovario de cobayas hemicastradas del ovario derecho o izquierdo y hemicastradas con autoinjerto y tratadas con GTD.

#### Fase folicular

Grupo	N	Ovario D.	Ovario I.	% H.C.	Útero	Peso corporal
Hem. D+A	6		15.4 $\pm$ 2.1	44.9 $\pm$ 20	284 $\pm$ 11	298.2 $\pm$ 13.2
Hem.D+A+GTD	5		14.4 $\pm$ 0.6	36 $\pm$ 5.3	206 $\pm$ 29*	262.3 $\pm$ 11.7
Hem. I+A	6	13.7 $\pm$ 0.7		35.5 $\pm$ 4.7	266 $\pm$ 19	301 $\pm$ 8.3
Hem.I+A+GTD	5	17.4 $\pm$ 1.7		68.9 $\pm$ 17	209 $\pm$ 32*	294.4 $\pm$ 8.6

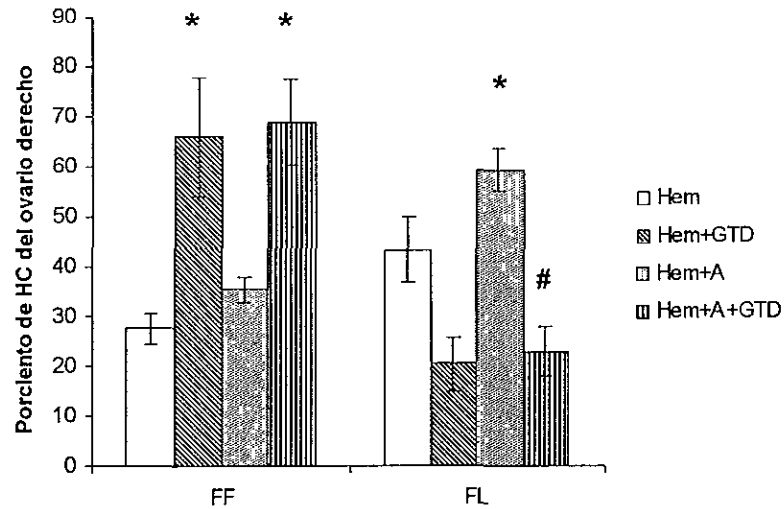
#### Fase luteal

Grupo	N	Ovario D.	Ovario I.	% H.C.	Útero	Peso corporal
Hem. D+A	7		14.5 $\pm$ 3.4	76.6 $\pm$ 41.6	168.9 $\pm$ 8.8	469.3 $\pm$ 24.6
Hem.D+A+GTD	7		11.9 $\pm$ 0.5	46.5 $\pm$ 5.5	177.2 $\pm$ 13.3	453.1 $\pm$ 22.2
Hem. I+A	6	13.7 $\pm$ 0.7		59.3 $\pm$ 8.3	202.5 $\pm$ 37.1	412.8 $\pm$ 8.3
Hem. I+A+GTD	5	10.8 $\pm$ 0.8		23.4 $\pm$ 9.5*	165.6 $\pm$ 24.7	506.2 $\pm$ 4.4

\* $p < 0.05$  vs. hemicastradas con autoinjerto (ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

Pero cuando se compara el porcentaje de hipertrofia compensadora del ovario derecho de las cobayas denervadas, autoinjertadas o no, con las solamente hemicastradas la denervación del ovario “*in situ*” aumentó este parámetro (Gráfica 16)

Gráfica 16. Media  $\pm$  e.e.m. del porcentaje de hipertrofia compensadora del ovario derecho en cobayas hemicastradas, hemicastradas y denervadas, hemicastradas, autoinjertadas y hemicastradas, autoinjertadas y denervadas con GTD, sacrificadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).

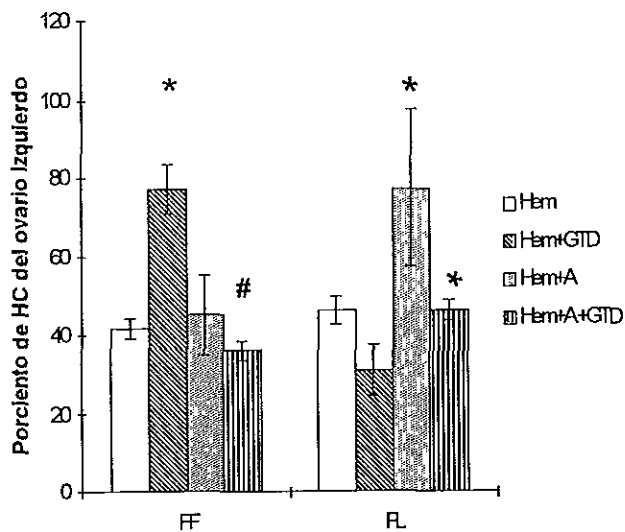


\* $p < 0.05$  vs. hemicastradas (Prueba de Fisher).

# $p < 0.001$  vs. hemicastradas con autoinjerto (Prueba de Fisher).

La denervación del ovario izquierdo también incrementa el porcentaje de hipertrofia compensadora cuando se compara con los animales solamente hemicastrados (Gráfica 17).

Gráfica 17. Media  $\pm$  e.e.m. del porcentaje de hipertrofia compensadora del ovario izquierdo en cobayas hemicastradas, hemicastradas y denervadas, hemicastradas y autoinjertadas y hemicastradas, autoinjertadas y denervadas con GTD, sacrificadas en la fase folicular (FF) o luteal (FL).

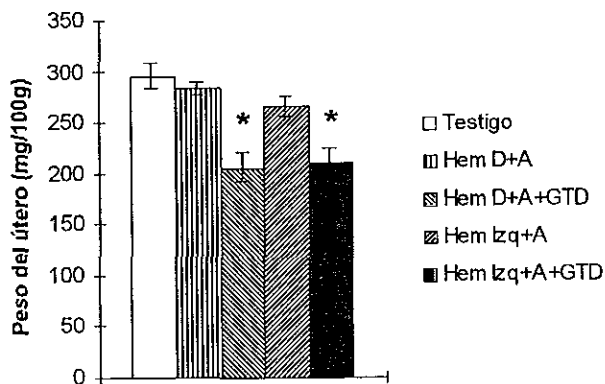


\* $p < 0.05$  vs. hemicastradas y vs. hemicastradas con autoinjerto (Prueba de Fisher).

# $p < 0.01$  vs. hemicastradas y denervadas (Prueba de Fisher)

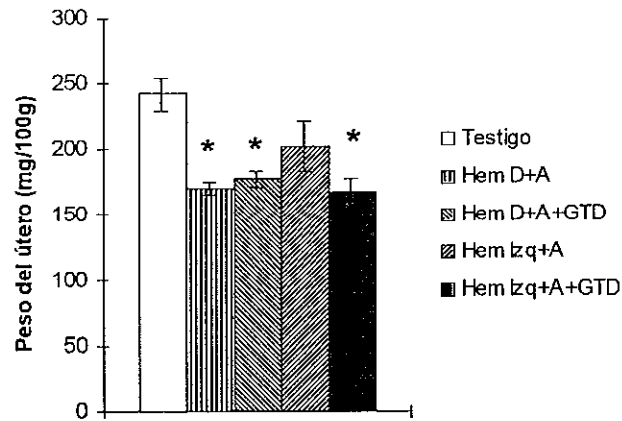
Los pesos uterinos fueron menores que en los animales testigo en los grupos de animales hemicastrados del ovario derecho, tratados con GTD sacrificados en la fase folicular o luteal. (Gráficas 18 y 19).

Gráfica 18. Media  $\pm$  e.e.m. del peso uterino (mg/100g) de cobayas testigo, hemicastradas con autoinjerto del ovario extirpado, y hemicastradas, autoinjertadas y denervadas con GTD, sacrificadas en la fase folicular (FF).



\* $p < 0.05$  vs. testigo (Prueba de "t" de Student).

Gráfica 19. Media  $\pm$  e.e.m. del peso uterino ( mg/100g ) de cobayas testigo, hemicastradas con autoinjerto del ovario extirpado, y hemicastradas, autoinjertadas y denervadas con GTD, sacrificadas en la fase luteal ( FL ).



\* $p < 0.05$  vs. testigo Prueba de "t" de Student).

Los ovarios de los testigos absolutos sacrificados en la fase folicular no presentaron cuerpos lúteos. Los sacrificados en la fase luteal tuvieron  $1.8 \pm 0.5$  (ovario derecho) y  $1.5 \pm 0.3$  (ovario izquierdo) (Tabla 9)

La hemicastración, tanto derecha como izquierda, adelantó la primera ovulación. Aunque el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios de los animales sacrificados en la fase folicular fue similar para ambos ovarios:  $2.5 \pm 0.4$  (ovario derecho "in situ") y  $2.4 \pm 0.4$  (ovario izquierdo "in situ") el porcentaje de animales ovulantes fue significativamente mayor cuando el ovario extirpado fue el derecho: 40% (ovario derecho "in situ") y 100% (ovario izquierdo "in situ") ( $p < 0.01$ , Fisher). (Tabla 9).

Los grupos de animales hemicastrados y autoinjertados sacrificados en la fase folicular, también presentaron cuerpos lúteos en los ovarios:  $2.6 \pm 0.2$  (ovario derecho "in situ") y  $3.0 \pm 0.4$  (ovario izquierdo "in situ"). El porcentaje de animales ovulantes fue similar para estos dos grupos: 83% (ovario derecho "in situ") y 80% (ovario izquierdo "in situ") (Tabla 9).

Los ovarios de los grupos de animales hemicastrados y hemicastrados y autoinjertados, que fueron denervados con GTD, y se sacrificaron en la fase folicular, no presentaron cuerpos lúteos.

Todos los grupos de animales hemicastrados y sacrificados en la fase luteal ovularon. Aunque no se encontraron diferencias significativas entre el número de cuerpos lúteos presentes en los ovarios, todos los animales presentaron ovulación compensadora (Tabla 9).

Tabla 9. Número de Cuerpos Lúteos y porcentaje de animales ovulantes (%AO) en cobayas testigo, hemicastradas, hemicastradas y denervadas con GTD, hemicastradas y autoinjertadas y hemicastradas, autoinjertadas y denervadas con GTD, sacrificadas en la fase folicular o en la luteal.

### Ovario derecho "in situ"

Grupo	Fase folicular			Fase luteal		
	N	No de C.L	% A O	N	No de C.L.	% A O
Testigos	4	0	0	4	1.8±0.5	4/4 (100%)
Hem	5	2.5±0.4*	2/5 (40%)**	5	3.4±0.2*	5/5 (100%)
Hem+GTD	5	0	0	5	2.6±0.2	5/5 (100%)
Hem +A	6	2.6±0.2*	5/6 (83%)**	5	3.2±0.2*	5/5 (100%)
Hem+A+GT D	6	1	1/6 (16%)	4	2.6±0.2	4/4 (100%)

\*p<0.001 vs testigo (Prueba de Kruskal-Wallis) y \*\*p<0.01 vs testigo (Prueba de Fisher).

### Ovario izquierdo "in situ"

Grupo	Fase folicular			Fase luteal		
	N	No de C.L	% A O	N	No de C.L.	% A O
Testigos	4	1	1/4	4	1.5±0.3	4/4 (100%)
Hem.	5	2.4±0.2*	5/5 (100%)**	4	3.0±0.7*	4/4 (100%)
Hem. +GTD	5	0	0	5	3.4±0.2*	5/5 (100%)
Hem. +A	5	3.0±0.4*	4/5 (80%)**	5	3.0±0.3*	5/5 (100%)
Hem+A+GT D	6	0	0	5	3.4±0.2*	5/5 (100%)

\*p<0.001 vs testigo (Prueba de Kruskal-Wallis) y \*\*p<0.01 vs testigo (Prueba de Fisher).

El análisis histológico de los autoinjertos mostró las siguientes características:

1- Ovario derecho autoinjertado. La mayoría de los folículos presentes eran del tipo antral, con escasos folículos preantrales. En el animal denervado sólo se encontraron folículos antrales.

2- Ovario izquierdo autoinjertado. Sólo se encontraron folículos preantrales. Pero cuando los animales fueron denervados con GTD, tres de los autoinjertos analizados presentaron todos los folículos antrales luteinizados y el cuarto, un cuerpo lúteo normal.

## DISCUSIÓN

Al igual que lo observado en la rata prepúber (123), la hipertrofia compensadora del ovario izquierdo es mayor que la del derecho. A diferencia de lo que sucede en la rata, en la cobaya se adelanta la edad de la ovulación, pero no de la apertura vaginal. Asimismo, la capacidad ovulatoria del ovario izquierdo es mayor que la del derecho.

Este hecho también es diferente a lo observado en la rata adulta hemicastrada, en la que el ovario derecho parece mantener la capacidad ovulatoria, mientras que la del ovario izquierdo es menor (30).

En la rata adulta esta diferencia de capacidad entre los ovarios depende de la inervación. La sección de los nervios vago modifica de manera diferente la ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario. Ambos resultados dependen del ovario remanente y del nervio seccionado (30). En la rata prepúber hemicastrada la sección unilateral del nervio ovárico superior modifica la ovulación compensadora, la que depende de la edad a la que se trata al animal, del ovario remanente y del nervio seccionado (123).

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, pensamos que en la cobaya prepúber entera, en el ovario izquierdo sería donde se originan las señales neuroendócrinas que llegan al hipotálamo y regiones extrahipotalámicas y al ovario derecho, necesarias para la regulación del funcionamiento del eje sistema nervioso central-hipófisis-ovario. Cuando se extirpa el ovario izquierdo, al perderse este control, el derecho mantiene parcialmente las funciones de ambos ovarios.

Nuestros resultados apoyan el concepto de un mecanismo en la respuesta ovárica a la denervación que es diferente para el ovario derecho y el izquierdo. Las diferencias en la respuesta del ovario derecho e izquierdo a la denervación podrían ser explicadas por el tipo de información aferente, eferente o ambas que recibe y envía cada uno de los ovarios, o por la existencia de un mecanismo de comunicación entre ambos ovarios como ya ha sido postulado en la rata (49).

El adelanto en la edad de la primera apertura vaginal y la ovulación anticipada en los grupos de animales hemicastrados con autoinjerto del ovario puede ser el resultado del aumento en la secreción de estrógenos por el ovario *"in situ"*, por el autoinjerto que presenta folículos antrales o por ambos.

En la rata hemicastrada con autoinjerto, se ha postulado que el ovario *"in situ"* con sus conexiones neurovasculares normales, mantiene la regulación de la secreción del eje hipotálamo-hipofisario a través de mecanismos endócrinos y neurales, en tanto que el autoinjerto estaría exclusivamente bajo el control de las gonadotropinas circulantes (49). Este mecanismo podría explicar la ausencia de ovulación adelantada en el grupo de animales hemicastrados con denervación del ovario *"in situ"*.

Como la denervación simpática producida por la administración de GTD tampoco modificó las concentraciones séricas de estradiol respecto a los animales testigo, el adelanto en la edad de la primera apertura vaginal puede ser el reflejo del aumento en la sensibilidad de la vagina denervada a los estrógenos.

En la cobaya prepúber la concentración de noradrenalina ovárica parece tener una influencia importante sobre el desarrollo folicular, la atresia y el proceso de la hipertrofia compensadora, ya que la denervación con 6-hidroxidopamina del ovario "*in situ*" disminuye el porcentaje de folículos preantrales y aumenta el de los preovulatorios (mayores de 700  $\mu\text{m}$ ) (39). La rata con medulectomía adrenal, presenta un retraso en la edad de la pubertad, que fue atribuido a la falta de catecolaminas circulantes (5)

Nuestros resultados parecen indicar que en la cobaya, como en la rata, las catecolaminas participan en la regulación del desarrollo folicular, la esteroidogénesis y que el ovario derecho y el izquierdo responden de manera diferente tanto a la denervación quirúrgica como a la farmacológica. Es probable que tanto la información que parte de la gónada, como la que llega a ésta desde el SNC sea diferente según el lado considerado (37, 38).

## Objetivo V

***Analizar los efectos de la hemicastración y el autoinjerto de ovario sobre la pubertad, la primera ovulación y la hipertrofia compensadora del ovario y su respuesta a las gonadotropinas.***

En la rata prepúber, la hemicastración y autoinjerto del ovario extirpado, no modifica la edad de la pubertad y aunque el ovario remanente presenta hipertrofia compensadora y cuerpos lúteos, el autoinjerto no ovula. Por el contrario, cuando el animal es castrado y autoinjertado ambos injertos ovulan. Para analizar si en la cobaya, especie con una inervación noradrenérgica más abundante que la rata, se reproducían estos resultados, y si el estímulo con gonadotropinas modificaba la reactividad del autoinjerto en el animal hemicastrado, se diseñó el siguiente experimento:

Se utilizaron 64 cobayas pertenecientes a la cepa Topeka, las que fueron distribuidas al azar en los siguientes grupos:

1- Nueve cobayas fueron inyectadas por vía s/c en el día 15 de vida con 20 u.i de FSH ovina (Bayer, Méx.). dosis que se repitió a las 48 hs. y 48 hs después se administraron 10 u.i. de hCG (Bayer).

2- Veintisiete animales de 15 días de edad fueron hemicastrados del ovario izquierdo, bajo anestesia con éter; en 21 cobayas, el ovario fue autoinjertado en tejido celular subcutáneo del dorso y 9 de ellas fueron inyectadas con FSH y hCG como en el grupo anterior.

3- Dieciocho animales fueron anestesiados, castrados y ambos ovarios fueron autoinjertados en el tejido celular subcutáneo del dorso. A 8 de ellos se les administraron FSH y hCG como en el primer grupo.

4- Doce cobayas, sin ningún tratamiento se usaron como grupo testigo.

Todos los animales fueron sacrificados en la fase luteal de la primera apertura vaginal.



## RESULTADOS

La edad de la apertura vaginal se adelantó en los animales tratados con FSH-hCG ( $41 \pm 1.8$  vs.  $55 \pm 1.7$  días en los testigos,  $p < 0.01$ ). No se observaron diferencias en las edades de apertura vaginal entre los grupos de cobayas hemicastradas con autoinjerto y castradas con autoinjerto. Este resultado no fue modificado por la administración de FSH-hCG.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en los pesos de ovarios y útero entre los grupos testigo y tratados con FSH-hCG (ovarios:  $15.2 \pm 0.8$  vs  $13.8 \pm 1.6$ ; útero:  $261 \pm 18$  vs.  $230 \pm 28$ ). El aumento en el peso de los ovarios de los animales hemicastrados con y sin autoinjerto del ovario fue similar. No se encontraron diferencias en el peso del útero de los grupos castrados y autoinjertados y hemicastrados (Tabla 10).

Tabla 10. Media  $\pm$  e.e.m. de los pesos ovárico y uterino (mg/100 gr) e hipertrofia compensadora ovárica de cobayas hemicastradas, hemicastradas y autoinjertadas, castradas y autoinjertadas a los 15 días de edad.

GRUPO	N	OVARIO D.	HCO	UTERO
Testigo	12	$7.9 \pm 0.5$	-	$261 \pm 18$
Hemicastradas	16	$11.0 \pm 0.7^*$	$49.8 \pm 8.7$	$197 \pm 8.8$
Hemicastradas + A	12	$12.3 \pm 0.8^*$	$68.6 \pm 10.3$	$270 \pm 28$
Castradas + A	10	-	-	$204 \pm 30.6$

\* $p < 0.001$  vs grupo testigo (ANOVA seguido de la Prueba de Tukey).

Como no se encontraron diferencias en el peso de los ovarios ni el porcentaje de hipertrofia compensadora entre los animales hemicastrados con y sin autoinjerto del ovario extirpado, la administración secuenciada de FSH-hCG se hizo solamente en los animales hemicastrados y autoinjertados. El peso del ovario "in situ" y del útero en el grupo de cobayas hemicastradas y autoinjertadas no se modificó por la administración de gonadotropinas (ovarios:  $13.7 \pm 1.6$  vs.  $11.0 \pm 0.7$ ; útero:  $268 \pm 28$  vs.  $204 \pm 30.6$ ). No se observaron diferencias en el porcentaje de hipertrofia compensadora ovárica entre el grupo no tratado y el inyectado con gonadotropinas, debido a la gran dispersión de los datos en este grupo ( $87.5 \pm 22$  vs.  $49.8 \pm 8.7$ ).

No se encontraron signos de ovulación en los ovarios autoinjertados de los animales hemicastrados, con o sin administración de gonadotropinas. Pero el ovario *in situ* presentó cuerpos lúteos

recién formados y folículos en diferentes etapas de desarrollo. En los animales castrados, los ovarios autoinjertados presentaron cuerpos lúteos en todos los casos. No se encontraron diferencias histológicas entre el grupo de animales castrados y autoinjertados y castrados, autoinjertados y tratados con gonadotropinas.

## **DISCUSIÓN**

Estos resultados permiten sugerir que en oposición a lo descrito por Mills y Reed (121), en la cobaya prepúber es posible adelantar la pubertad, medida por la edad de apertura vaginal y de la primera ovulación, tanto por la estimulación hormonal, como por la manipulación del ovario. El adelanto de la pubertad producido por la administración secuenciada de FSH y hCG refleja probablemente el aumento de la secreción de estrógenos. En 1980 Peddie (140), mostró que en el ovario de la cobaya de 15 días de edad se produce una onda de atresia folicular. Como en el presente estudio la FSH se administró a animales de 15 días es posible que la atresia folicular haya sido bloqueada por el tratamiento hormonal. El adelanto en la edad de la pubertad podría ser el resultado de un aumento en la secreción de estrógenos, ya que el peso uterino es similar entre los grupos tratados y testigo. Estos resultados permiten suponer que la llamada "etapa crítica" de la cobaya no es tan absoluta como fue postulado.

La ausencia de ovulación en los ovarios autoinjertados a los animales hemicastrados concuerda con observaciones similares obtenidas en la rata prepúber y adulta (12). Estos resultados se interpretaron por la presencia de la inervación normal del ovario *in situ* y su falta en el autoinjerto, que explican la hipertrofia compensadora del primero y la ausencia de ovulación en el segundo. En los animales castrados, ambos ovarios autoinjertados están exclusivamente bajo el control de la gonadotropinas endógenas.

## Objetivo VI

*Estudiar los efectos del estímulo secuencial con PMSG y hCG iniciado a partir del día 10 de vida a cobayas denervadas desde el nacimiento, sobre la pubertad medida por la edad de la apertura vaginal y la ovulación.*

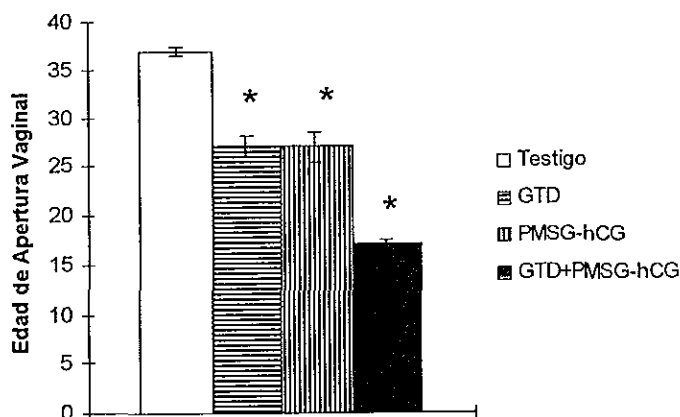
Para analizar si el ovario de la cobaya prepúber tiene la capacidad de reaccionar a un estímulo con gonadotropinas y si la inervación simpática a del órgano juega un papel en esta reacción, se realizaron los siguientes experimentos:

Doce cobayas de diez días de edad fueron inyectadas por vía s.c. con 10 u.i. de PMSG (Sigma) y 56 hs después con 10 u.i de hCG (Sigma). Seis cobayas recién nacidas fueron inyectadas con guanetidina disuelta en solución salina a la dosis de 20 mg/K por vía s.c., dos veces por semana y en el día diez tratadas con PMSG y hCG como en el grupo anterior. Los animales fueron sacrificados en la primera fase folicular o en la primera fase luteal. Como grupos de comparación se utilizaron los animales testigo absoluto y denervado con guanetidina a partir del nacimiento, sacrificados en cada fase del ciclo estral.

## **RESULTADOS**

En comparación con el grupo testigo absoluto, la edad de la primera apertura vaginal se adelantó de manera significativa en los animales tratados con PMSG-hCG, siendo mayor el adelanto en los animales denervados (Gráfica 20).

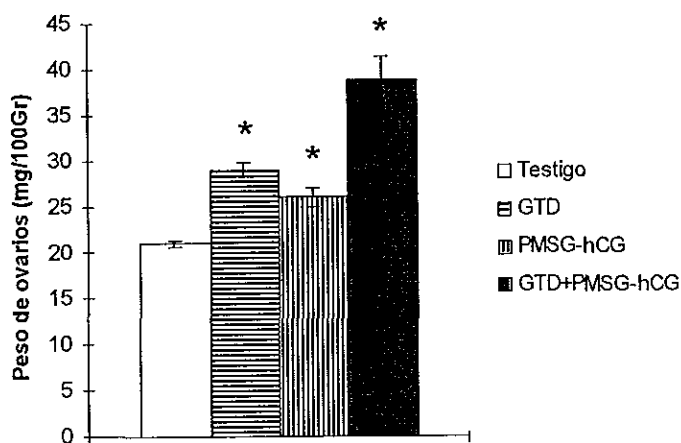
Gráfica 20. Edad de la primera apertura vaginal en cobayas testigo, denervadas a partir del día del nacimiento, tratadas con PMSG-hCG y denervadas tratadas con PMSG-hCG.



\* $p < 0.001$  vs. grupo testigo (Prueba de Kruskal-Wallis).

En comparación con el grupo testigo absoluto, el peso de los ovarios de los animales tratados con PMSG-hCG, denervados o no, mostró diferencias significativas que dependen de la forma de expresión de los resultados, pesos absolutos o relativos, y del momento del ciclo estral en el que se sacrificaron los animales (Tabla 11, Gráfica 21).

Gráfica 21. Media  $\pm$  e.e.m. de los pesos (mg/100g) de los ovarios de cobayas testigo, denervadas con GTD a partir del día del nacimiento, tratadas con PMSG-hCG y denervadas, tratadas con PMSG-hCG.



\* $p < 0.01$  vs. testigo (Prueba de "t" de Student).

El peso absoluto del útero de los animales denervados tratados con PMSG-hCG sacrificados en la fase folicular, fue significativamente menor que el de las cobayas normales estimuladas con gonadotropinas. Esta diferencia no se observó cuando los animales fueron sacrificados en la fase luteal, ni cuando los resultados se expresan en forma relativa (mg/100 g). Este último resultado puede ser

explicado por las diferencias observadas en el peso corporal de los animales y en las edades a las que fueron sacrificados (Tabla 11).

Tabla 11. Media  $\pm$  e.e.m. de los pesos absolutos y relativos de ovarios, útero y adrenales de cobayas testigo, denervadas a partir del día del nacimiento, tratadas con PMSG-hCG y denervadas tratadas con PMSG-hCG autopsiadas en la fase folicular o en la luteal.

## Pesos absolutos

### *fase folicular*

Grupo	N	Masa Ovárica	Útero	Masa Adrenal	Peso Corporal
Testigo	16	68.3 $\pm$ 2.6	916 $\pm$ 59	103 $\pm$ 4.8	327 $\pm$ 6.0
GTD	12	75.5 $\pm$ 3.6	474 $\pm$ 46*	92 $\pm$ 4.1	261 $\pm$ 8.5*
PMSG-hCG	6	70.2 $\pm$ 10	728 $\pm$ 74	102 $\pm$ 9.5	265.4 $\pm$ 23*
GTD+PMSG-hCG	6	86.6 $\pm$ 10.5	510 $\pm$ 34#	106 $\pm$ 8.2	219.3 $\pm$ 9.7*

\*p<0.01 vs grupo testigo (ANOVA seguido de la Prueba de Tukey).

### *fase luteal*

Testigo	6	75.4 $\pm$ 6.8	1067 $\pm$ 127	161 $\pm$ 5.1	448 $\pm$ 13
GTD	6	77.9 $\pm$ 4.9	795 $\pm$ 7	173 $\pm$ 6.5	405 $\pm$ 14
PMSG-hCG	6	90.3 $\pm$ 10.8*	941 $\pm$ 157	157 $\pm$ 11.6	461 $\pm$ 11.5

## Pesos relativos

### *fase folicular*

Grupo	N	Masa Ovárica	Útero	Masa Adrenal
Testigo	16	20.9 $\pm$ 0.8	292 $\pm$ 20	31.6 $\pm$ 1.5
GTD	12	28.7 $\pm$ 1.3*	179 $\pm$ 13.4*	36.4 $\pm$ 1.6
PMSG-hCG	6	26.0 $\pm$ 1.9*	278 $\pm$ 20	39.0 $\pm$ 2.8*
GTD+PMSG-hCG	6	39.4 $\pm$ 4.6#!	236 $\pm$ 19	38.8 $\pm$ 4.5*!

### *fase luteal*

Testigo	6	16.8 $\pm$ 1.4	242 $\pm$ 33	35.4 $\pm$ 2.2
GTD	6	21.5 $\pm$ 0.8*	199 $\pm$ 23.6	40.3 $\pm$ 2.0
PMSG-hCG	6	18.3 $\pm$ 1.8	185 $\pm$ 28.6	34.0 $\pm$ 2.7

\*p<0.05 vs grupo testigo (ANOVA seguido de la Prueba de Tukey).

#p<0.05 vs grupo denervado. (ANOVA seguido de la Prueba de Tukey).

!p<0.05 vs grupo administrado con gonadotropinas (ANOVA seguido de la Prueba de Tukey).

Cuando la autopsia de los animales tratados con PMSG-hCG a los 10 días se realizó en la fase folicular, no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones plasmáticas de estradiol entre

los animales testigos y los tratados con PMSG-hCG ( $82.33 \pm 7.8$  pg/ml vs.  $94.39 \pm 5$ ) pero las de progesterona están aumentadas ( $1.47 \pm 0.2$  ng/ml vs.  $0.33 \pm 0.2$  de los animales testigo  $p < 0.01$  't' de Student).

Cuando estas cobayas fueron sacrificadas en la fase luteal, la concentración de estradiol es mayor a la del grupo testigo absoluto, en tanto que la de progesterona es significativamente menor, lo que permite suponer que los cuerpos lúteos formados no son totalmente funcionantes. (Tabla 12).

Tabla 12. Media  $\pm$  e.e.m. de las concentraciones séricas de estradiol (pg/ml) y progesterona (ng/ml) de cobayas testigo, denervadas a partir del día del nacimiento, o tratadas con PMSG-hCG a los 10 días, sacrificados en la fase luteal.

Grupo	N	Estradiol	Progesterona
Control	5	$86.93 \pm 9.8$	$1.63 \pm 0.42$
GTD RN	3	$147.52 \pm 10.5^*$	$0.59 \pm 0.12^*$
PMSG-hCG 10 Días	6	$106.76 \pm 15.5^*$	$0.97 \pm 0.18^*$

\* $p < 0.01$  vs. control (Prueba de "t" de Student).

El estudio histológico de los ovarios mostró la presencia de cuerpos lúteos en los grupos de animales tratados con PMSG-hCG autopsiados en ambas etapas del ciclo estral. De los 6 animales autopsiados en la fase folicular, 1 presentó luteinización de la granulosa. Los otros 5 presentaron un cuerpo lúteo por ovario, pequeños, de los cuales 3 contenían al ovocito. Los 6 animales autopsiados en la fase luteal, presentaron cuerpos lúteos normales en ambos ovarios. No se encontraron folículos luteinizados.. Los animales que fueron denervados desde el nacimiento y tratados a los 10 días de vida con PMSG-hCG, presentaron en su mayoría, cuerpos lúteos con ovocito atrapado.

## DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio refuerzan nuestra conclusión anterior de que la edad de la pubertad en la cobaya, puede ser modificada, tanto por la administración de gonadotropinas, como por la denervación noradrenérgica del ovario, a edades más tempranas que la correspondiente al período crítico establecido por Mills y Reed (121). El máximo adelanto en la apertura vaginal, se obtuvo en los animales denervados desde el nacimiento y tratados con gonadotropinas a los 10 días de vida. Aunque, en su mayoría, los ovarios de estos animales presentan luteinización folicular con ovocito atrapado, nuestros resultados parecen señalar que la inervación noradrenérgica del ovario tiene un efecto modulador de tipo inhibitorio sobre la acción de las gonadotropinas. El incremento en la concentración sérica de estradiol, en la fase

luteal, correlaciona bien con el aumento en el número y el diámetro de folículos antrales medidos en los ovarios de cobayas denervadas con GTD desde el nacimiento. El aumento en la concentración sérica de progesterona en la fase folicular, observado en los animales denervados desde el nacimiento, podría estar vinculado al aumento de peso de las adrenales, glándula que sintetiza progesterona a nivel de la capa reticular. Los grupos de animales denervados o tratados con gonadotropinas y autopsiados en la fase luteal, presentan concentraciones plasmáticas de progesterona menores que los testigo. Esto podría indicar que los cuerpos lúteos formados no son totalmente funcionales. El hecho de que cobayas denervadas a partir de los 20 días de edad, puestas a preñar alrededor de los 90 días hayan tenido una camada menor que la de las testigos (2.6 crías vs. 4.0  $p < 0.003$  U de Mann-Whitney) parecen apoyar esta hipótesis (Riboni, datos no publicados).

## Discusión General

Además de los efectos generales que resultan de la denervación simpática periférica por la administración de guanetidina, los resultados de este trabajo concuerdan con el concepto de que en las hembras prepúberes la inervación simpática ovárica juega un papel modulador de tipo inhibitorio en la sensibilidad de la gónada a las gonadotropinas (62, 156).

Dado que en la rata recién nacida la inyección de guanetidina resulta en el retraso de la pubertad (6, 62, 110) las diferencias entre esos resultados y los del presente trabajo realizado en cobaya podrían reflejar diferencias de especie o de abundancia en la inervación noradrenérgica.

El adelanto en la edad de la apertura vaginal refleja que los estrógenos fueron secretados antes de lo normal por parte del ovario. Este hecho está apoyado por la similitud en la concentración de estrógenos observada en los animales denervados y los testigos; en los animales denervados el aumento en la concentración plasmática de estradiol aparece diez días antes que en los testigos.

La mayoría de los autores aceptan que conforme el folículo aumenta de tamaño también se incrementa la secreción de estrógenos (81). Dado que el número de folículos sanos con diámetro superior a las 600  $\mu\text{m}$ , presentes en los ovarios de las cobayas denervadas, autopsiadas en la fase folicular, fué mayor que en los controles la cantidad de unidades productoras de estrógenos está aumentada, lo cual explicaría el adelanto de la apertura vaginal. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que la vagina denervada sea más sensible a los estrógenos.

El aumento en la concentración plasmática de progesterona observada en los animales denervados no puede explicarse por diferencias en la función luteal, porque ninguna de las cobayas testigos o denervadas, sacrificados en la fase folicular, presentaron cuerpos lúteos en los ovarios. Estudios "in vitro" realizados con células tecales, mostraron que la adición de noradrenalina, adrenalina o isoproterenol al medio de cultivo, incrementan la producción de andrógenos en respuesta a la hCG (59). La alteración producida por la guanetidina sobre la inervación simpática del ovario podría resultar en un aumento en la producción de andrógenos, los que serían convertidos en estrógenos por la aromatasas activa, lo cual explicaría las concentraciones normales de estos últimos.

También se debe considerar la posibilidad de que la administración de guanetidina resulte en una alteración funcional, morfológica o de ambos tipos de las fibras sensoriales ováricas. En la rata



crónicamente denervada con este fármaco, se ha descrito un aumento del número de fibras nerviosas que expresan el neuropéptido relacionado al gene de la calcitonina (1, 122) el cual ha sido relacionado con muchas funciones sensoriales periféricas, particularmente con la transmisión dolorosa (122).

No existe en la literatura información bibliográfica que especifique cuál es el tipo de información transmitida por las fibras sensitivas del ovario. Podríamos postular que dicha inervación envía información sobre la secreción de sustancias del tipo de la "activina" la cual afecta la secreción de FSH hipofisaria (154) lo que daría por resultado, si éstas existen en el ovario de la cobaya, el aumento del número y del diámetro de los folículos antrales presentes en los ovarios de los animales tratados con guanetidina. Además la denervación simpática incompleta podría resultar en una hipersensibilidad del folículo a las gonadotropinas.

Otra posibilidad sería que la administración de guanetidina provoque cambios en el contenido ovárico del neuropéptido Y y de la sustancia P. Existen evidencias de que ambos péptidos estimulan la secreción de progesterona "in vitro" (143).

Las evidencias existentes en la literatura acerca de los efectos de la guanetidina en el contenido de sustancia P en las fibras nerviosas ováricas, es controversial. En tanto Aberdeen y cols (1) no detectaron cambios en la cantidad de sustancia P luego de la administración de guanetidina a ratas hembras Mione y cols (122) en un estudio similar, describen un aumento significativo del péptido

La ovulación adelantada observada en los animales con denervación simpática noradrenérgica coincide con el postulado de Ross (157) de que "las hormonas esteroideas median algunos de los efectos de las gonadotropinas sobre el crecimiento y la diferenciación folicular", porque los estrógenos inducen la aparición de receptores a la LH (155) y la actividad aromatasa en las células de la granulosa (43).

La mayor concentración de estradiol en el plasma de las cobayas denervadas desde el nacimiento y sacrificadas en la fase luteal, puede ser explicado por el mayor número de folículos sanos observados en los ovarios de estos animales. Por el contrario, los animales denervados a partir de los diez días de vida, presentan valores de estradiol parecidos a los controles. Esto coincide con el hecho de que el número de folículos sanos fué similar entre ambos grupos

La concentración de progesterona sérica encontrados en los grupos de animales denervados y sacrificados en la fase luteal, permite sugerir que la inervación noradrenérgica ovárica tiene un papel estimulante en el control de la función del cuerpo lúteo. Sin embargo no podemos descartar, dado que el peso de las glándulas adrenales de los animales denervados fué mayor que el de los testigos, que la progesterona circulante sea de origen adrenal.

La mayor incidencia de signos de atresia en los folículos con diámetro superior a las 600  $\mu\text{m}$  observados en los ovarios de los animales denervados no puede ser explicada exclusivamente por modificaciones endócrinas. Existen evidencias de que:

1- la noradrenalina actúa de manera sinérgica con la LH/hCG, estimulando la secreción de andrógenos (59). Por lo tanto, éstos deberían estar disminuídos en las cobayas denervadas con GTD.

2- durante la etapa peripuberal de la rata, el número de receptores  $\beta$  adrenérgicos es elevado y su estimulación resulta en un aumento de la liberación de testosterona (4). Aunque no se ha demostrado la existencia de este tipo de receptores en el ovario de la cobaya, si éstos existen, la disminución en las concentraciones de NA provocaría una caída de las concentraciones de andrógenos.

3- la denervación del ovario de la rata preñada provoca una disminución de la actividad de la  $\delta 5$ - $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (23) y por lo tanto la capacidad de síntesis de andrógenos estaría dismuída.

4- según Greenwald y Roy (81) las concentraciones esteroideas de los folículos atrésicos muestran una caída en la secreción de estrógenos como consecuencia de la disminución en la producción de andrógenos tecales.

Por lo tanto podemos suponer que el aumento en el número de folículos atrésicos encontrados en los ovarios de las cobayas denervadas con GTD podría deberse, además de la disminución en las concentraciones de andrógenos, a modificaciones de la vascularización tecal (81).

Las características más importantes de la atresia son la aparición de la  $\Delta 5$ - $3\beta$  hidroxiesteroide deshidrogenasa en las células de la granulosa, la disminución en las concentraciones de estradiol y progesterona y el aumento en las concentraciones de androstenediona, dihidrotestosterona y testosterona (81).

Las diferencias en la cantidad de folículos y en el diámetro promedio medido en los ovarios derecho e izquierdo de los animales enteros, testigos y tratados con guanetidina, así como la respuesta diferente a la denervación periférica que presentan los folículos sanos y atrésicos puede estar relacionada y reflejar, diferencias en la información neural que llega a cada uno de los ovarios (38).

Nuestros resultados permiten suponer que la inervación simpática del ovario participa en la regulación del crecimiento, maduración y atresia folicular. Como estos mecanismos regulatorios presentan asimetría entre el ovario derecho y el izquierdo, es posible que la información neural se origine en una porción lateralizada del sistema nervioso central de la cobaya, como ha sido demostrado en la rata (13, 37, 51, 126).

Mills y Reed (121) consideran la existencia de una "etapa crítica" inmediatamente anterior al primer estro, durante el cual el ovario de la cobaya prepúber es capaz de ovular en respuesta a las gonadotropinas exógenas. En esta etapa la ovulación puede ser inducida por la administración de gonadotropinas, en tanto que animales más jóvenes tratados con cuatro inyecciones diarias de FSH ovina no muestran signos de secreción estrogénica y por lo tanto, 24 horas después de la última inyección no se producen la apertura vaginal ni la ovulación. Este concepto no es apoyado por los resultados de Curry cols (39) ni por los del presente trabajo, ya que la administración de PMSG seguida 56 horas después por hCG a cobayas prepúberes de diez o quince días de edad, resultó en una pubertad adelantada (medida por la presencia de cuerpos lúteos en los ovarios) (153).

La administración de PMSG y de hCG a cobayas de diez días de vida, denervadas con guanetidina o no desde el nacimiento, produjo adelanto de la apertura vaginal respecto al grupo no tratado. El mayor adelanto se observó en el grupo denervado y tratado con gonadotropinas. Este dato nos permite suponer que la secreción de estrógenos se adelantó ya que el número de unidades foliculares secretoras fue mayor (152).

Como la edad de apertura vaginal y la ovulación fueron más tempranos en los animales denervados y tratados con gonadotropinas, y el peso de los ovarios fue mayor que en los testigos y en los tratados solamente con gonadotropinas, sugerimos que la sensibilidad del folículo a las gonadotropinas está modulada en forma inhibitoria por la inervación noradrenérgica del ovario. Esta interpretación es apoyada por los resultados de Curry y cols (39) quienes encontraron que la denervación unilateral de ovario de cobayas de 20 días de edad, provocada por la inyección local de 6-hidroxidopamina, aumentaba el número de folículos de tamaño mediano y grande. El hecho de que el número de folículos atrésicos sea mayor en las cobayas denervadas y que la incidencia de atresia sea más alta en los ovarios de los

animales denervados y tratados con PMSG-hCG, apoya la idea de que la inervación noradrenérgica ovárica tiene un papel modulador de tipo inhibitorio.

El peso menor del útero observado en los animales denervados, tratados o no con gonadotropinas, permite sugerir que la inervación noradrenérgica juega un papel modulador de tipo estimulante en la respuesta del útero a los estrógenos. En la cobaya intacta, la inervación noradrenérgica no parece regular la secreción de estrógenos en forma estimulante, ya que en el grupo denervado y tratado con gonadotropinas el peso uterino fué mayor que en los denervados sin tratamiento con gonadotropinas. Como ya se señaló, la sobre-estimulación de los receptores adrenérgicos del ovario resulta en un aumento de la secreción de progesterona y andrógenos (59).

D'Albora y Barcia (42) en la médula del ovario de la rata y Les Dees y cols (112) en la mona mostraron la presencia de neuronas. Estas neuronas podrían ser la base morfológica de la vía hipotética neural capaz de transmitir información desde el ovario al SNC, como ha sido postulado previamente (49).

Existen algunas evidencias de que el ovario derecho y el izquierdo se comportan de manera diferente. Por ejemplo se han descrito diferencias en la capacidad ovulatoria entre ambos ovarios en: la mujer (146), la cerda (93), la mona(124) y la ternera (Pierson RA y Ginther OJ, 1987, citados por ref. 81). En la rata estas diferencias están relacionadas con el número de ovocitos liberados por el ovario derecho o el izquierdo, con la hipertrofia compensadora que sigue a la hemicastración y su dependencia de la inervación ovárica (12) aunque la concentración de noradrenalina es similar en ambos ovarios (32).

Las diferencias en la cantidad de folículos y en el diámetro promedio medido en los ovarios derecho e izquierdo de los animales enteros, testigos y tratados con guanetidina, así como la distinta respuesta a la denervación periférica que presentan los folículos sanos y atrésicos puede estar relacionada y reflejar, diferencias en la información neural que llega a cada uno de los ovarios. Esta posibilidad estaría apoyada también por el hecho de que la hemicastración realizada en el animal prepúber, resulta en una hipertrofia compensadora del ovario mayor para el izquierdo que para el derecho.

La presencia de cuerpos lúteos en el ovario remanente de estos animales, sacrificados en la fase folicular podría estar relacionada además, con la existencia de una comunicación intergonadal que explique las diferencias en el porcentaje de hipertrofia compensadora entre ambos ovarios. La posibilidad de una comunicación intergonadal, de tipo neural o química ya ha sido planteada en la rata por otros autores (123, 126).

El adelanto de la edad de la primera apertura vaginal y la ovulación en los animales con autoinjerto del ovario extirpado indica un aumento en la secreción de estrógenos. Esto está apoyado por la presencia de folículos antrales en la mayoría de los autoinjertos y el aumento en las concentraciones plasmáticas de estradiol. La denervación simpática de estos animales modifica el aspecto del autoinjerto dependiendo del ovario extirpado y autoinjertado. En el caso del ovario izquierdo la presencia de folículos antrales luteinizados y de un cuerpo lúteo, parece apoyar la hipótesis de que en el animal entero, es el ovario izquierdo el que comanda las funciones de ambas gónadas. Esta posibilidad podría deberse a diferencias en el número de fibras nerviosas aferentes, eferentes o a la presencia de algún factor de tipo no nervioso capaz de difundir por vía sanguínea entre ambos ovarios.

## CONCLUSIONES

- ◆ La inervación simpática del ovario de la cobaya prepúber modula de manera inhibitoria el desarrollo folicular y la esteroidogénesis.
- ◆ La inervación simpática del ovario modula la sensibilidad del folículo a las gonadotropinas.
- ◆ La primera ovulación en la cobaya, como en la oveja, se produce durante el primer diestro.
- ◆ No existe una "etapa crítica" como la descrita por otros autores o ésta no es tan absoluta.
- ◆ En condiciones normales el ovario derecho y el izquierdo son diferentes y responden de manera distinta a la denervación tanto farmacológica como quirúrgica.
- ◆ Se sugiere una hipótesis sobre los mecanismos que participan en el control de la pubertad en la cobaya. (Figuras 7 y 8)

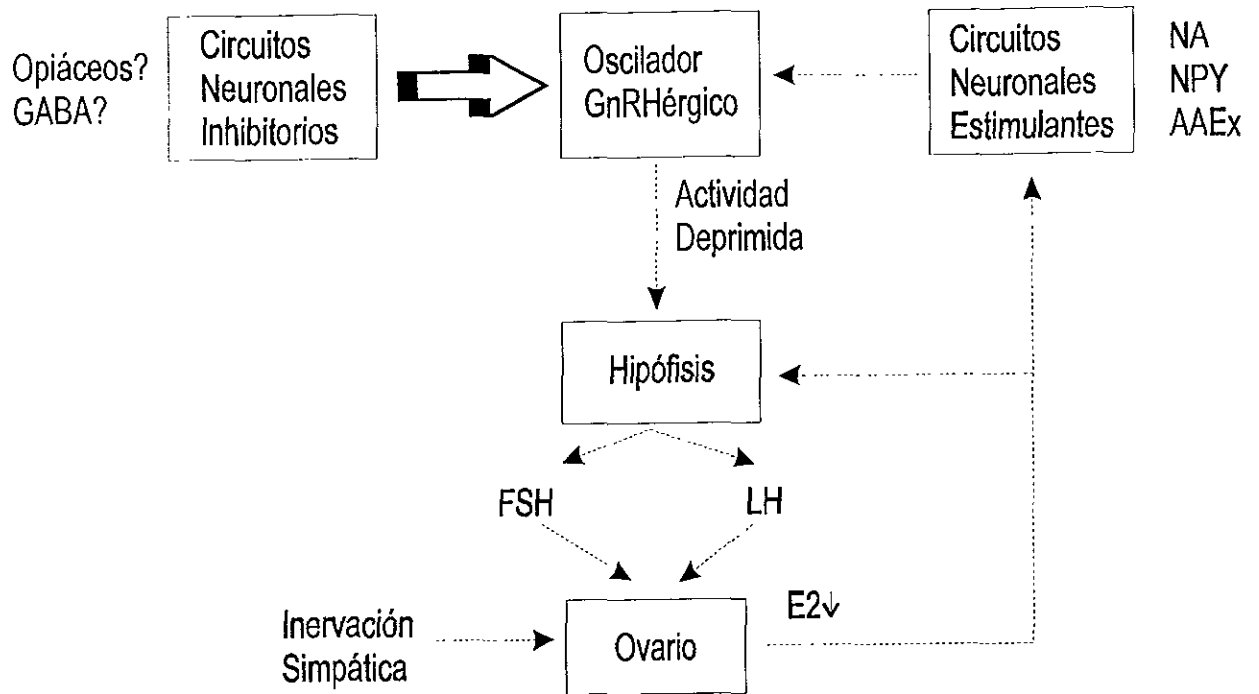


Figura 7. Durante la etapa prepuberal de la cobaya el oscilador neuronal GnRHérgico estaría sometido a los efectos inhibidores de origen central mediados por neurotransmisores de tipo opiáceo y GABAérgicos y probablemente al de los esteroides ováricos. Los circuitos neuronales estimulantes de la secreción del GnRH estarían deprimidos por la Noradrenalina (NA), el Neuropeptido Y (NPY) y Aminoácidos de tipo excitatorio (AAEx). Como consecuencia, la amplitud y la frecuencia de los "pulsos" de GnRH serían insuficientes para mantener los "picos" de la LH. Además la inervación simpática del ovario establecería un mecanismo de control de tipo inhibitorio sobre el desarrollo folicular, por lo cual las cantidades de esteroides ováricos, sobre todo del E2, serían demasiado bajas para estimular a los circuitos neuronales que tienen efectos estimulantes sobre la actividad del oscilador neuronal.

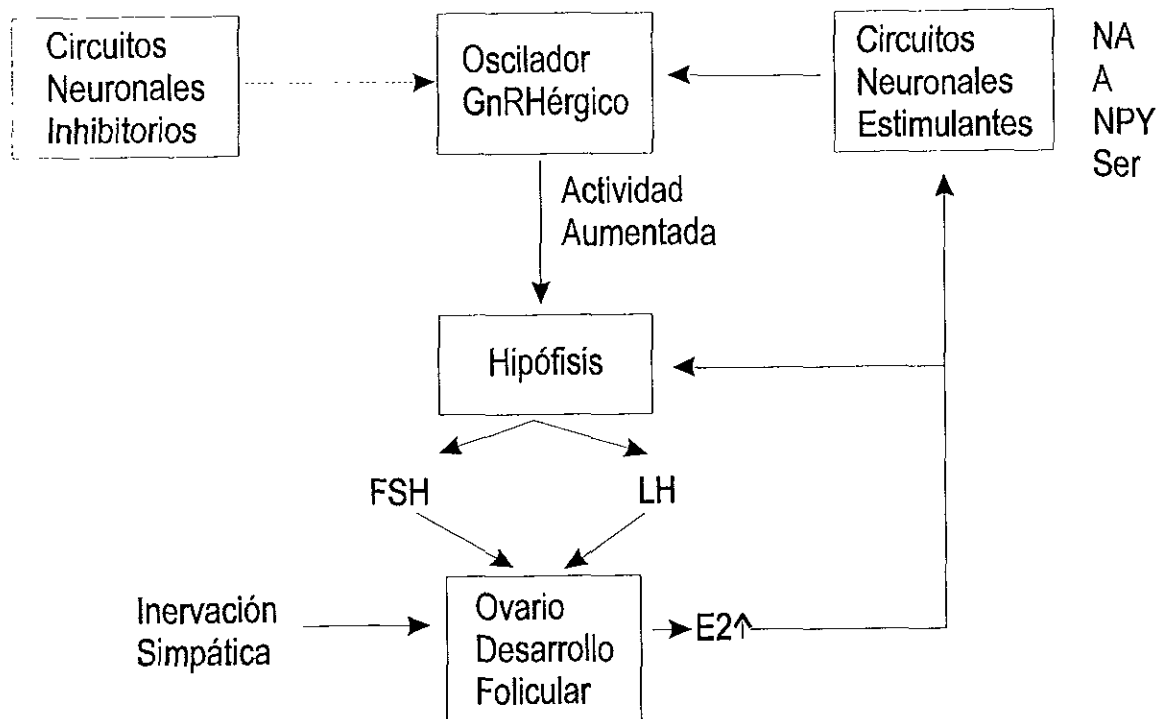


Figura 8. En la etapa peripuberal, los mecanismos inhibitorios centrales perderían efectividad, en tanto que los circuitos estimulantes, activados por la Noradrenalina (N), Adrenalina (A), Neuropeptido Y (NPY) y Serotonina (Ser) aumentarían su actividad. Como consecuencia de este cambio, el oscilador neuronal GnRHérgico presentaría un incremento en su frecuencia, su amplitud o en ambas, estimulando a los gonadotropos hipofisarios a secretar mayor concentraciones de FSH y de LH. Los efectos combinados de las dos gonadotropinas, sobre todo de los "pulsos" de LH, acelerarían el desarrollo de los folículos ováricos. Este proceso asociado a la disminución del control de tipo inhibitorio que ejercían las catecolaminas sobre el proceso de crecimiento y maduración folicular provocarían el incremento en la secreción de E2. El aumento en las concentraciones plasmáticas de E2 actuaría sobre los circuitos neuronales estimulantes del oscilador neuronal y sobre la hipófisis, sensibilizando a los gonadotropos a los efectos del GnRH.



## PERSPECTIVAS

Considerando que los animales con denervación simpática desde el nacimiento o en el día diez de vida, tienen un aumento en el número de folículos antrales y que las cobayas que fueron denervadas a partir del día veinte tuvieron un menor número de crías que las testigo, es importante analizar el desarrollo folicular y el número de ovulaciones en animales con estos tratamientos en el segundo y tercer ciclo estral.

Como los animales adultos jóvenes que fueron denervados con guanetidina, presentaron un alargamiento del ciclo estral (en la fase de diestro), nos interesa analizar los efectos de la denervación con este fármaco, administrado en el periodo prepuberal (días diez y veinte de edad) sobre el tercer y cuarto ciclos estrales.

Dado que no existen referencias en la literatura sobre la presencia de receptores a FSH, LH y  $\beta$  adrenérgicos en el ovario de la cobaya prepúber, éste es otro aspecto a desarrollar en el futuro.

En el ovario de rata se ha demostrado la existencia de péptidos opioides (endorfinas). Como no existe información respecto a la cobaya, nos interesa buscar este tipo de péptidos en el ovario del animal prepúber, y correlacionar este dato con las concentraciones de noradrenalina.

## BIBLIOGRAFÍA

1. ABERDEEN J, CORR L, MILNER P, LINCOLN J, BURNSTOCK G. 1990. Marked increases in calcitonine gene-related peptide- containing nerves in the developing rat following long-term sympathectomy with guanethidine. *Neuroscience* 35: 175-184.
2. ADVIS JP, SIMPKINS JW, CHEN HT, MEITES J. 1978. Relation of biogenic amines to the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 103,11-16.
3. ADVIS JP, SMITH-WHITE S, OJEDA SR.1981. Activation of GH short loop negative feedback delays puberty in the female rat. *Endocrinology* 108:1343-1352.
4. AGUADO LI, PETROVICS L, OJEDA, SR. 1982. Ovarian  $\beta$ -adrenergic receptors during puberty onset: Characterization, distribution and coupling to steteroidogenic responses. *Endocrinology* 110: 1124-1132.
5. AGUADO LI, OJEDA SR, 1984. Effect of selective removal of the adrenal medulla on female sexual development. *Biol. Reprod.* 31: 605-618.
6. ALBUQUERQUE-ARAUJO WIC, ROSA-E-SILVA AAM, FRANCI JAA, FAVARETTO ALV, ANTUNES-RODRIGUEZ J. 1990. The effect of guanethidine-induced denervation of the peripheral sympathetic nervous system on the onset of puberty in female rats. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* 23: 1181-1184.
7. ALVAREZ EO, HANCKE JL, ADVIS JP. 1977. Indirect evidences of prolactin involvement in precocious puberty induced by hypothalamic lesions in female rats. *Acta Endocrinol.* 85: 11-17.
8. ANDREWS WW, OJEDA SR. 1981. A detailed analysis of the serum LH secretory profiles of conscious, free-moving female rats during the time of puberty. *Endocrinology* 109: 2032-2039.
9. ARON C, MARCH CH, MARESCAUX J. 1948. Caractère reflète, neuroendocrinien, de l'hyperactivité réactionnelle de l'ovaire restant après hémicastration chez le cobaye. *C.R. Soc. Biol.* 142: 1558-1560.
10. AUBERT ML, GRUMBACH MH, KAPLAN SL.1977.The ontogenesis of human fetal hormones. IV. Somatostatin, luteinizing hormone-releasing factor and thyrotropin-releasing factor in hypothalamus and cerebral cortex of human fetuses 10-22 weeks of age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 44: 1130-1141.
11. AUBERT ML, BEGEOT MI, WINIGER BP, MOREL G, SIZONENKO PC, DUBOIS PM. 1985. Ontogeny of hypothalamic luteinizing hormone-releasing hormone (GnRH) and pituitary GnRH receptors in fetal and neonatal rats. *Endocrinology* 116: 1565-1576.
12. AYALA ME, DOMINGUEZ R. 1988. Ovulatory response of follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin by autografted ovary in unilaterally ovariectomized adult rat with peripheral denervation by guanethidine treatment. *La Rev. Invest. Clín. México.* 40: 149-155.
13. AYALA ME, ROSAS P, DOMINGUEZ R. 1994. Different effects of unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation. *Brain Res. Bull* 40: 149-155.

14. AX RL, RYAN RJ. 1979. FSH stimulation of 3H-glucosamine glicane incorporation into proteoglycans by porcine granulosa cells in vitro. *Metabolism* 49: 646-648.
15. BAUER-DANTOIN A, McDONALD JK, LEVINE JE. 1991. Neuropeptide Y potentiates luteinizing hormone (LH)-releasing hormone-stimulated LH surges in pentobarbital-blocked proestrus rats. *Endocrinology* 129: 402-408.
16. BARRY J, DU BOIS MP. 1976. Immunoreactive LRF neurosecretory pathways in mammals. *Acta Anat.* 94: 497-503.
17. BARRY J, DU BOIS MP, POULAIN P, LEONARDELLI J. 1973. Caracterization et topographie des neurones hypothalamiques immunoréactifs avec des anticorps anti-LRF de synthèse. *C.R. Acad. Sci.* 276:3191-3193.
18. BLANK MS, PANERAI AE, FRIESEN HG. 1979. Opioid peptides modulate luteinizing hormone secretion during sexual maturation. *Science* 203:1129-1131.
19. BOOKHOUT CG. 1945. The development of the guinea pig ovary from sexual differentiation to maturity. *J. Morphol.* 77: 233-263.
20. -BOYAR RM, ROSENFELD RS, KAPEN S, FINKESTEIN JW, ROFFWARG HP, WEITZMAN ED y HELLMAN L. 1974. Human puberty simultaneous augmented secretion of luteinizing hormone and testosterone during sleep. *J. Clin. Invest.* 54:609-618.
21. BURDEN HW. 1972. Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig. *J. Anat.* 133: 455-462.
22. BURDEN HW.1985. The adrenergic innervation of Mammalian Ovaries. En: *Catecholamines as hormone regulators*.Eds: N.Ben-Jonathan J.M.Bahr R.I.Weiner. Raven Press. N.Y. pp. 261-278.
23. BURDEN HW, LAWRENCE IE Jr. 1977. Effects of denervation on localization of  $\Delta^5$ -3- $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat ovary during pregnancy. *Acta Anat.* 97: 286-290.
24. BURDEN HW, LAWRENCE IE Jr., LOUIS TMY.1985. The adrenergic innervation of the guinea-pig ovary during prenatal and postnatal periods. *Acta Anat.* 122: 193-196.
25. BURGNON C, BLOCH B, FELLMAN D 1976. Mise en evidence cytoimmuno-cytologique des neurones a LH-RH chez le foetus humain. *C.R. Acad. Sci. Paris* 282:1625-1628.
26. BURGNON C, BLOCH B, FELLMAN D 1977. Etude immuno-cytologique des neurones hypothalamiques a LH-RH chez le foetus humain. *Brain Res.* 128: 249-262.
27. BRINK CE, GROB HS. 1973. Response of the denervated mouse ovary to exogenous gonadotropins. *Biol. Reprod.* 9: 108.
28. BYSKOV AG. 1978. Follicular atresia. En: *The Vertebrate Ovary*. De.: ER Jones. New York-London Plenum Press. Pp 533-562.

29. CARETTE B, POULAIN P. 1982. Postsynaptic inhibitory effects of met- and leu-enkephalin on endocrine and adjacent neurones in the preoptic-septal region of the guinea-pig. *Reg. Peptides* 3:125-133.
30. CHAVEZ R, CRUZ ME, DOMINGUEZ R. 1987. Differences in the ovulation rate of the right and left ovary in the unilaterally ovariectomized rats: effects of ipsi and contralateral vagus nerve on the remaining ovary. *J. Endocrinol.* 113:397-401.
31. CHAVEZ R, CARRIZOZA L, DOMINGUEZ R. 1991. Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Med. Sci. Res.* 19:41-42.
32. CHAVEZ R, MORALES L, GONZALEZ ME, DOMINGUEZ R. 1994. Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies. *Med. Sci. Res.* 22: 789-790.
33. CRAMER OM, BARRACLOUGH CA. 1978. The actions of serotonin, norepinephrine and epinephrine on hypothalamic process leading to adenohipophysial luteinizing hormone release. *Endocrinology* 103: 694-703.
34. CROIX, D. 1976. Variations des taux seriques de LH et FSH durant le periode post-natale chez le Cobaye. *C.R.hbdo.Acad. Sci. (Series D)* 282:649-651.
35. CROIX D, FRANCHIMONT P. 1975. Changes in the serum levels of the gonadotrophins, progesterone and estradiol during the estrus cycle of the guinea pig. *Neuroendocrinology* 12: 1-11.
36. CROWE SJ, CRUSHING H, HOMANS J. 1910. Experimental hypophysectomy. *Bull Johns Hopkins Hospital* 21: 127-169.
37. CRUZ ME, MORAN JL, JARAMILLO LP, DOMINGUEZ R. 1990. Differential effects of unilateral hypothalamic lesions on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rats. *J. Endocrinol.*124:37-41.
38. CRUZ ME, DOMINGUEZ R. 1992. Modifications in the follicular compartment of the ovaries of adult rats with unilateal lesion of the hypothalamus. *Med. Sci. Res.* 20: 939-941.
39. CURRY TE, LAWRENCE IE, BURDEN H. 1984. Ovarian sympathectomy in the guinea pig.II. Effects on follicular development during the prepubertal period and following exogenous gonadotropin stimulation. *Cell and Tissue Res.* 236: 593-596.
40. DACHEUX F. 1984. Functional differentiation of the anterior pituitary cells in the fetal pig: an ultrastructural immunocytochemical study. *Cell Tiss. Res.* 235: 623-633.
41. D'ALBORA H, CARLEVARO E, RIBONI L, de los REYES L, ZIPITRIA D, DOMINGUEZ R. 1974. 'Advanced puberty' in female guinea pigs treated with human chorionic gonadotrophin (HCG) or testosterone enantate (ET) at birth. *Hormone Res.* 5:344-350.

42. D'ALBORA H, BARCIA JJ. 1996. Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neurosc. Lett.* 205: 65-67.
43. DANIEL SAJ, ARMSTRONG DT. 1983. Involvement of estrogens in the regulation of granulosa cell aromatase activity. *Canadian J. Physiol. Pharmacol.* 61: 507-511.
44. DAVIDSON JM. 1974. Hypothalamic-pituitary regulation of puberty, evidence from animal experimentation. En: *The Control of the Onset of Puberty*. Eds: M.M.Grumbach, G.D.Grave F.E.Mayer. Wiley and Sons, New York, p 79.
45. DEBELJUK L, AKIMURA A, SCHALLY AV. 1972. Pituitary responsiveness to LH-releasing hormone in intact female rats of different ages. *Endocrinology* 90: 1499-1502.
46. DELITALIA G, MELONI T, MASALA T, ALAGNA S, DEVILLA L, CORTI R. 1978. Effect of LRH on gonadotropin secretion in newborn male infants. *Clin. Endocrinol. Metab.* 45:689-690.
47. DOHLER KD, WUTTKE W. 1974. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology* 94,1003-1008.
48. DOMINGUEZ R. 1990. Different ovulatory response of the right and left ovary to unilateral lesion and anaesthesia of the cervico-vaginal plexus. *J. Endocrinol.* 124:43-45.
49. DOMINGUEZ R, RIBONI L. 1971. Failure of ovulation in autografted ovary of hemispayed rat. *Neuroendocrinology* 7: 164-170.
50. DOMINGUEZ R, ZIPITRIA,D. 1980. Longterm effects of guanethidine administration on the ovulatory response of the rat. *IRCS Medical Science* 8: 352.
51. DOMINGUEZ-GONZALEZ A, CHAVEZ R. 1993. Asymmetric effects of unilateral lesions in the midbrain central gray matter on ovulation in the adult female rat. *Med. Sci. Res.* 21: 513-514.
52. DONOVAN BT. 1990. Puberty in the guinea pig and rabbit. En: *Control of the Onset of Puberty*.Eds: M.M.Grumbach, P.C.Sizonenko M.L.Alberts. William and Wilkins. Baltimore. Cap. 5, pp143-155.
53. DONOVAN BT, LOCKHART AN. 1972. Gonadal hormones and the control of ovulation in the guinea-pig. *J. Endocrinol.* 55: 599-607.
54. DONOVAN BT, PEDDIE M. 1973. The development of fetal and infant guinea-pig gonadal tissue in adult hosts. *J. Reprod. Fertil.* 35: 582-583.
55. DONOVAN BT, KILPATRICK MJ. 1978. Effect of neonatal gonadectomy on the concentration of gonadotropins in the plasma during development in the guinea-pig. *J. Endocrinol* 76,179-180.
56. DONOVAN BT, terHAAR MB, LOCKHART AN, MacKINNON ECB, MATTOCK JM, PEDDIE HJ. 1975 a. Changes in the concentration of LH in plasma during development in the guinea-pig. *J. Endocrinol.* 64,511-520.
57. DONOVAN BT, ter HAAR MB, LOCKHART AN, PEDDIE HJ.1975 b. Changes in the concentration of FSH in plasma during development in the guinea-pig. *J. Endocrinol.* 64: 521-528.

58. DROUVA SV, GAUTRON JP, PATTOU E, LAPLANTE E, KORDON C. 1986. Effects of estradiol and progesterone on immunoreactive forms of hypothalamic Luteinizing hormone-Releasing Hormone. *Neuroendocrinology* 43: 32-37.
59. DYER CA, ERICKSON GF. 1985. Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotrophin-stimulated androgens biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* 64: 521-528.
60. EDWARDS RG. 1974. Follicular fluid. *J. Reprod. Fertil.* 37:189-219.
61. FEDER HH. 1981. Estrous cyclicity in mammals. En: *Neuroendocrinology of Reproduction*. N.T. Adler Ed. Cap. 10. P 285. Plenum Press New York.
62. FLORES A, AYALA ME, DOMINGUEZ R. 1990. Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation of ovulation in the pubertal and adult rat? *Med. Sci. Res.* 18: 817-818.
63. FLUGGE G, OERTEL W, WUTTKE W. 1986. Evidence for estrogen-receptive GABAergic neurons in the preoptic anterior hypothalamic area of the rat brain. *Neuroendocrinology* 43: 1-5.
64. FOÀ C. 1900. La greffe des ovaries en relation avec quelques questions de biologie générale. *Arch. Ital. Biol.* 34: 43-73.
65. FOSTER DL, LEMOUS JA, JAFFE RB, NISWENDER GD. 1975. Sequential patterns of circulating luteinizing hormone and follicle-stimulating hormone in the female sheep from early postnatal life through the first estrous cycle. *Endocrinology* 97: 985-994.
66. FOSTER DL. 1977. Luteinizing hormone and progesterone secretion during sexual maturation of the rhesus monkey; short luteal phases during the initial menstrual cycles. *Biol. Reprod.* 17: 584-590.
67. FOSTER DL, RYAN KD. 1979. Endocrine mechanisms governing transition into adulthood: a marked decrease in inhibitory feedback action of estradiol on tonic secretion of luteinizing hormone in the lamb during puberty. *Endocrinology* 105:896-904.
68. FOSTER DL. 1980. Comparative development of mammalian females: proposed analogies among patterns of LH secretion in various species. En: *Problems in pediatric endocrinologie*. Eds: C La Lanza, AW Root. New York Academic Press pp 193-210.
69. FOSTER DL, RYAN KD, APKOFF H. 1985. Hourly administration of luteinizing hormone induces ovulation in prepubertal female sheep. *Endocrinology* 115: 1179-1185.
70. FOSTER DL, EBLING FJP, RYAN KD, YELLON SM. 1989. Mechanisms timing puberty: a comparative approach. En: *Control of the Onset of Puberty III. Proceedings of the 3<sup>rd</sup> International Conference on the Control of the Onset of Puberty*. Amsterdam, The Netherlands. 7-10 May. Eds: H.A. Delamare-van der Waal, TM. Plant, GP van Rees y J.Schdemaker. *Excerpta Medica*, Amsterdam, New York, Oxford. International Congress Series 861. pp 227-245.
71. FOSTER D.L. 1994. Puberty in the sheep. En: *Physiology of reproduction*. E.Knobil y J.D. Neill eds. Raven Press. New York Cap. 41, pp 411-451.

72. FUNKESTEIN B, NIMROD A, LINDNER MR. 1980. The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal rat ovaries. *Endocrinology* 106: 98-106.
73. GERENDAI Y, MARCHETTI B, MANGERI S, ROXAS MA, SEAPAGNINI V. 1978. Prevention of compensatory ovarian hypertrophy by local treatment of the ovary with 6-hydroxydopamine. *Neuroendocrinology* 27: 272-278.
74. GLUCKMAN PD, GRUMBACH MM, KAPLAN, SL. (1980). The human fetal hypothalamus and pituitary gland: the maturation of neuroendocrine mechanisms controlling the secretion of pituitary growth hormone, prolactin, gonadotropine and adrenocorticotropin-related peptides. En: *Maternal-Fetal Endocrinology*. Tulchinsky D, Ryan KJ eds. Philadelphia, W.B. Saunders, pp 196-232.
75. GLUCKMAN PD, MARTI-HENNEBERG C, KAPLAN SL., LI CH, GRUMBACH MM (1980). Hormone ontogeny in the ovine fetus. X. The effects of  $\beta$ -endorphin and naloxone on circulating growth hormone, prolactin and chorionic somatomammotropin. *Endocrinology* 107: 76-80.
76. GOODMAN RL, KNOBIL E. 1981. The sites of action of ovarian steroids in the regulation of LH secretion. *Neuroendocrinology* 32: 57.
77. GORSKI RA. 1990. Sexual Differentiation of the Brain: Comparative aspects. En: *Control of the Onset of Puberty*. Eds.: MM Grumbach, PC Sizonenko, ML Aubert. William & Wilkins Balt. Maryl. Cap 9, pp 231-250..
78. GRANT L, STUMPF W. 1973. Localization of 3H-estradiol and catecholamines in identical neurons in the hypothalamus. *J. Histochem. Cytochem* 21: 404.
79. GREENWALD GS. 1978. Follicular activity in the Mammalian Ovary. En: *The Vertebrate Ovary. Comparative Biology and Evolution*. Ed: R.E. Jones. Plenum Press. New York. Cap. 19. Pp 639-689.
80. GREENWALD GS. 1993. How does daily treatment with hCG induce superovulation in the cyclic hamster. *Biol. Reprod.* 48: 133-142.
81. GREENWALD GS, ROY SK. 1994. Follicular development and its control. En: *Physiology of Reproduction*. Cap. 12, pp 629-724. Eds: E Knobil and JD Neill. New York: Raven Press Ltd.
82. GROB H. 1969. Effect of abdominal denervation on vaginal opening, estrous and ovarian histology on mice. *Ann. Zool.* 9: 1086.
83. GROOM GV, BOYUS AR. 1973. Effect of hypothalamic releasing factors and steroids on release of gonadotropins by organ cultures of human foetal pituitaries. *J. Endocrinol.* 59: 511-522.
84. -GRUMBACH MM, ROTH JC, KAPLAN SL, KELCH RP. 1974. Hypothalamic-pituitary regulation of puberty in man: evidence and concepts derived from clinical research. En: *Control of the onset of*

- puberty. Grumbach, MM, Grave, BD, Mayer, FE. eds. New York: Wiley, pp 115-166.
85. GRUMBACH MM, KAPLAN SL. 1994. The neuroendocrinology of human puberty: an ontogenetic perspective. En: Control of the Onset of Puberty. Eds.: MM Grumbach, PC Sizonenko, ML Aubert. William & Wilkins Balt. Maryl. Cap 1, pp 1-68.
86. -GUGTEN S, PALKOVITS M, WIJNEN H, VESTEG D. 1976. Regional distribution of adrenaline in rat brain. Brain Res. 107: 171-175.
87. HARRIS GW, JACOBSON D. 1952. Functional grafts of the anterior pituitary gland. Proc. R. Soc. London (Biol) 139: 263-276.
88. HEATH JW, EVANS BK, GANNON BJ, BURNSTOCK G, JAMES VB. 1972. Degeneration of adrenergic neurones following guanethidine treatment: an ultrastructural study Virchows Archiv. Abteilung B-Zell pathologie. 11: 182-197.
89. HERITAGE A, GRANT L, STUMPF W. 1977. 3H-estradiol in catecholamine neurons of rat brain stem: combined localization by autoradiography and formaldehyde-induced fluorescence. J. Comp. Neurol. 176: 607-630.
90. HILL RT. 1949. Adrenal cortical physiology of spleen grafted and denervated ovaries in the mouse. Exp. Med. Surg. 7: 86-98.
91. HILL RT. 1962. Paradoxical effects of ovarian secretions. En : The Ovary. DE.: S.Zuckerman. Vol 2, pp231-261. Academic Press New York.
92. HORVATH TL, NAFTOLIN F, KALRA SP, LERANTH C. 1992. Neuropeptide-Y innervation of  $\beta$ -endorphin-containing cells in the rat mediobasal hypothalamus: a light and electron microscopic double immunostaining analysis. Endocrinology 131: 2461-2467.
93. HUNTER RHF, COOK B, BAKER TG. 1985. Intersexuality in five pigs, with particular reference to estrous cycle, the ovotestis, steroid hormone secretion and potential fertility. J. Endocrinol. 106: 233-242.
94. JARRY H, HIRSCH B, LEONHARDT S, WUTTKE N. 1992. Amino acid neurotransmitter release in the preoptic area of rats during the positive feedback actions of estradiol on LH release. Neuroendocrinology 56: 133-140.
95. JOHNSON EM, ALOE L. 1974. Supresion of the in vitro and in vivo cytotoxic effects of guanethidine in sympathetic neurons by nerve growth factor. Brain Res. 1: 519-532.
96. JOHNSON EM, MANNING PT. 1984. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic neurones. Internat. Rev. Neurobiol. 25. 1-37.



97. KALRA S, McCANN S. 1974. Effects of drugs modifying catecholamine synthesis on plasma LH and ovulation in the rat. *Neuroendocrinology* 15: 79-91.
98. KAPLAN SL, GRUMBACH MM, AUBERT ML. 1976. The ontogenesis of pituitary hormones and hypothalamic factors in the human fetus: Maturation of Central Nervous System regulation of anterior pituitary function. *Recent Prog. Horm. Res.* 32: 161-234.
99. KENNEDY JP, WORTHINGTON CA, COLE ER. 1974. The postnatal development of the ovary and uterus of the Merino lamb. *J. Reprod. Fert.* 36: 275-282.
100. KIMURA F, KAWAKAMI M. 1982. Episodic Lh secretion in the immature male and female rat as assessed by sequential blood sampling. *Neuroendocrinology* 35;128-132.
101. KINASHITA F, NAKAI Y, KATAKAMI H, KATO G, YAJIMA H, IMURA H. 1980. Effect of  $\beta$  endorphin on pulsatile luteinizing hormone release in conscious castrated rats. *Life Science* 27: 843.
102. KNOBIL E, PLANT TM, WILDT L, BELCHETZ PE, MARSHALL G. 1980. Control of the rhesus monkey menstrual cycle: Permissive role of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* 207: 1371.
103. KNOBIL E. 1989. The GnRH pulse generator. En: *Control of the Onset of Puberty*. III. Eds: H.A. Delamare-van der Waal, T.M. Plant, G.P. van Rees y J. Schedemaker. *Excerpta Medica*, Amsterdam, New York, Oxford. *International Congress Series* 861. pp 11-20.
104. KORDON C, DROUVA SV, ENJALBERT JP, LEBLANC P. 1989. The hypothalamic control of GnRH secretion. En *Control of the Onset of Puberty* III. Eds: H.A. Delamare-van der Waal, T.M. Plant, G.P. van Rees y J. Schoemaker. *Excerpta Medica*, Amsterdam, New York, Oxford. *International Congress Series* 861. pp 79-87.
105. KORDON C, DROUVA SV, MARTINEZ DE LA ESCALERA G, WEINER G. 1994. Role of classic and peptide neurotransmitters in the neuroendocrine regulation of Luteinizing Hormone and Prolactin. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds.: E. Knobil and J.D. Neill. *Cap.* 27: 1621-1681.
106. KREY LC, SILVERMAN AJ. 1978 a. The luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks of the guinea pig brain. II. The regulation of gonadotropin secretion and the origin of terminals in the median eminence. *Brain Res.* 157: 247-255.
107. KREY LC, SILVERMAN AJ. 1978 b. The luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks of the guinea pig brain. III. The regulation of cyclic gonadotropin secretion. *Brain Res.* 229: 429-444.
108. KREY LC, HESS DL, BUTTLER R, ESPINOSA-CAMPOS J, LU KH, PIVA F, PLANT TM, KNOBIL E. 1981. Medial basal hypothalamic disconnection and the onset of puberty in the female rhesus monkey.

- Endocrinology 108: 1944-1948.
- 109.KULKARNI PS, WAKADE AR, KIRPEKAR SM. 1976. Sympathetic innervation of the guinea-pig uterus and ovary. *Am.J.Physiol.* 230: 1400-1405.
- 110.LARA HE, MDONALD JK, AHMED CE, OJEDA SR. 1990. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupt ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127: 2199-2209.
- 111.LEHMAN MN, ROBINSON JE, KARSCH FJ, SILVERMAN AJ. 1986. Immunocytochemical localization of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) pathways in sheep brain during anestrus and de mid-luteal phase of the estrous cycle. *J. Comp. Neurol.* 224,19-35.
- 112.LES DEES W, HINEY JK, SCHULTEA TD, MAYERHOFER A, DANILICHIK M, DISSEN GA, OJEDA S. 1995. The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology* 136: 5760-5768.
- 113.LEVASSEUR MC. 1977. Thoughts on puberty: initiation of gonadotropin function. *Ann. Biol. An.* 17 (A3) 345-361.
- 114.LIPSCHÜTZ A, KALLAS H, PAEZ R. 1929. Hypophyse and Gesetz der pubertät *Pflugers Arch.* 221: 695-721. Citado por: TM Plant. Puberty in primates. Eds: E Knobil and JD Neill. 1994. *The Physiology of Reproduction* 2nd Ed. Raven Press Ltd. New York. Cap. 42, pp 453-485.
- 115.MANNING PT, POWERS CW, SCHMIDT RE, JOHNSON EM. 1983. Guanethidine induced destruction of peripheral sympathetic neurones occurs by an immune-mediated mechanism. *J. Neurosc.* 4: 714-724.
- 116.MARSHALL PE. GOLDSMITH PC.1980 Neuroregulatory and neuroendocrine GnRH pathways in the hypothalamus and forebrain of the baboon. *Brain Res.* 193:353-372.
- 117.MAULEON, P. 1969. Oogenesis and folliculogenesis. En: Cole, H.H., Cupps, P.T. eds. *Reproduction in domestic animals.* 2<sup>nd</sup> Ed. New York, Academic Press, pp 187-215.
- 118.McDONALD JK, LUMPKIN MD, SAMPSON WK, McCANN SM. 1985. NPY affects secretion of luteinizing hormone and growth hormone in ovariectomized rats. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 82: 561.
- 119.MEDERO M, DOMINGUEZ R. 1977. Induction of precocious puberty in newborn female guinea pigs by a positive feedback action of estrogens. *Hormone Res.* 8: 224-230.
- 120.MEIJIS-ROELOFS HMA, UILOENBROEK JThJ, deGREEF WE, de JONG FH, KRAMER P. 1975.Gonadotrophin and steroid level around the time of first ovulation in the rat. *J. Endocr.* 67;275-282.

121. MILLS PG, REED M. 1971. The onset of first estrus in the guinea-pig and the effects of gonadotropins and estradiol in the immature animal. *J. Endocrinol* 50: 329-337.
122. MIONE MC, CAVANAGH JFR, KIRPATRICK KA, BURNSTOCK G. 1992. Plasticity in expression of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in ganglia and fibres following guanethidine and/or capsaicin denervation. *Cell Tiss. Res.* 268: 491-504.
123. MORALES LEDESMA L. 1991. Estudio de la participación del nervio ovárico superior en el proceso de pubertad espontánea de la rata entera y hemicastrada. Tesis de Maestría.
124. MORSE AM, VAN WAGENEN G. 1936. Observations upon ovulation in primates. *Am. J. Obst. Gynecol.* 32: 823-832.
125. NAFTOLIN F, BRAWER JR. 1977. Sex hormones as growth promoting factors for the endocrine hypothalamus. *J. Steroid. Biochem.* 8:275-282.
126. NANCE DM, BHARGAVA M, MYATT GA. (1984). Further evidence for hypothalamic asymmetry in endocrine control of the ovary. *Brain Res. Bull.* 13: 651-655.
127. NASS TE, TERESAWA E. 1981. Maturational changes in the negative and positive feedback LH release by ovarian steroids in female guinea-pigs. *Biol. Reprod.* 24: (Suppl. 1) 68A.
128. NASS TE, TERESAWA E, DIERSCHKE DJ, GOY RW. 1984 a. Developmental changes in Luteinizing hormone secretion in the female guinea pig. I. Effects of ovariectomy, estrogen, and luteinizing hormone-releasing hormone. *Endocrinology* 115:220-226.
129. NASS TE, TERESAWA E, DIERSCHKE DJ, GOY RW. 1984 b. Developmental changes in luteinizing hormone secretion in the female guinea pig. II Positive feedback effects of ovarian steroids. *Endocrinology* 115: 227-232.
130. NEGRO-VILAR A, ADVIS J, OJEDA S, McCANN S. 1982. Pulsatile luteinizing hormone (LH) pattern on ovariectomized rats: involvement of norepinephrine and dopamine in the release of LH releasing hormone and LH. *Endocrinology* 111: 932-938.
131. NICHOLSON G, GREELEY G, HUMM J, YOUNGBLOOD W, KIZER J. 1978. Lack of effect of noradrenergic denervation of the hypothalamus and medial preoptic area on the feedback regulation of gonadotropin secretion and the estrous cycle. *Endocrinology* 103:539-566.
132. NORMAN RL, SPIES HG. 1981. Brain lesions in infant female rhesus monkey: effects on menarche and first ovulation and on diurnal rhythms of prolactin and cortisol. *Endocrinology* 108: 1723-1729.
133. OATES JA. 1995. Antihypertensive agents and the drugs therapy of hypertension. En: Goodman and Gilman: *The Pharmacological Basis of Therapeutics*. 9a. Ed. C. 33, pp 780-808. Eds in Chief: JG Hardman & LE Limbird. Eds PB Molinoff & RW Ruodon. USA McGraw Hill.
134. O'DONNELL R, SAAR N. 1974. The effects of 6-hydroxydopamine and guanethidine on peripheral adrenergic nerves in the guinea pig. *European J. Pharmacol.* 28: 251-256.

- 135.OJEDA SR, JAMESON HE. 1977. Developmental patterns of plasma in pituitary growth hormone (GH) in the female rat. *Endocrinology* 100:881-889.
- 136.OJEDA SR, ADVIS JP, ANDREWS WW. 1980. Neuroendocrine Control of the Onset of puberty in the rat. *Federation Proc.* 39: 2365-2371).
- 137.OJEDA SR, CAMPBELL WB. 1982. An increase in hypothalamic capacity to synthesize PGE2 precedes the first preovulatory surge of gonadotropins. *Endocrinology* 111; 1031-1037.
- 138.OJEDA SR, URBANSKI HF. 1994. Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds: E.Knobil y J. Neill. Raven Press Ltd. New York . Cap.40 .pp. 363-409.
- 139.PADMANABHAM V, MIEHER CD, BORONDY M, I'ANSON H, WOOD RI, LANDEFELD TD, FOSTER DL, BEITINS IZ 1992. Circulating bioactive follicle-stimulating hormone and less acidic follicle-stimulating isoforms increase during experimental induction of puberty in the female lamb. *Endocrinology* 131: 213-220.
- 140.PEDDIE MJ. 1980. Follicular development in the immature guinea-pig. *J. Endocrinol.* 84: 323-331.
- 141.PETERS H, BYSKOV AG, LINTERN-MOORE S, FABER M, ANDERSEN M. 1973. The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J. Reprod. Fert.* 35: 139-141.
- 142.PETERS H, 1979. Some aspects of early follicular development. En: Migdley, A.R. y Sadler, W.A. Eds. *Ovarian follicular development and function*. New York, Raven Press. pp 1-13.
- 143.PITZEL L, JARRY J, 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.
- 144.PLANT TM. 1988. Puberty in primates. En: *The physiology of reproduction*. Eds: Knobil E y Neill JD. Raven Press, New York. Cap 42 pp 1763-1788.
- 145.PLANT TM, GAY VL, MARSHALL GR, ARSLAN M. 1989. Puberty in monkeys is triggered by chemical stimulation of the hypothalamus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 2506-2510.
- 146.POTASHNIK G, INSLER B, MEIZNER J. 1987. Frequency, sequence, and side of ovulation in women menstruating normally. *British Med. J.* 294: 219.
- 147.POULAIN P, CARETTE B. 1976. Action of iontophoretically applied prolactin on septal and preoptic neurons in the guinea-pig. *Brain Res.* 116: 172-176.
- 148.POULAIN P, MARTIN-BOUYER L, BEAUVILLAIN JC, TRAMU G. 1984. Study of the efferent connections of the enkephalinergic magnocellular dorsal nucleus in the guinea-pig hypothalamus using lesions, retrograde tracing and immunohistochemistry: evidence for a projection to the lateral septum. *Neuroscience* 11:331-343.

- 149.RAMIREZ VD. 1973. Endocrinology of Puberty. En: Handbook of Physiology. Section 7: Endocrinology Vol. II. Female Reproductive System. Part I. Eds. R.O.Greep y E.B.Astwood. American Physiology Society. Washington. Chap. 1, pp 1-28.
- 150.RAMIREZ VD, McCANN SM. 1963. Comparison of the regulation of luteinizing hormone (LH) secretion in immature and adult rats. *Endocrinology*. 72:452.
- 151.RIBONI L, DOMINGUEZ R.1983. La inervacion del ovario y su influencia en los mecanismos de control de su funcion. VIII Reunion Anual de la Academia de Investigacion en Biologia de la Reproduccion.Ixtapa. Zihuatanejo. p 345.
- 152.RIBONI L, DOMINGUEZ D. 1995. Noradrenergic peripheral denervation in new born female guinea pig results in the acceleration of follicular growth. En: International Symposium on Life Cycle of the Ovarian Follicle. Fort Lauderdale. Florida. USA. Inc. p 43.
- 153.RIBONI L, ESCAMILLA C, DOMINGUEZ R. 1995. Advanced puberty in ovariectomized and hemiovariectomized female guinea pigs with ovarian autograft and treated with gonadotropins. *Med. Sci. Res.* 23: 307-308
- 154.RIBONI L, ESCAMILLA C, CHAVIRA R, DOMINGUEZ R. 1997. Effects of peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine administration on the mechanisms regulating puberty in the female guinea pig. *J. Endocrinol.* (En prensa).
- 155.RICHARDS JS. 1979. Hormonal control of ovarian follicular development. *Rec. Progr. Horm. Res.* 35: 343-368.
- 156.ROSAS P, ARGÜELLO MS, DOMINGUEZ R. 1989. Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. *Med. Sci. Res.* 17: 285-286.
- 157.ROSS GT. 1990. Follicular development: the life cycle of the follicle and puberty. En: Control of the onset of puberty Cap 17, pp 376-386. Eds: MM Grumbach, PC Sizonenko, ML Aubert Williams & Wilkins Baltimore, Maryl. USA.
- 158.ROWLANDS IW, PARKES AS. 1966. Hypophysectomy and the gonadotropins. En: Marshall's Physiology of Reproduction. Vol 3. Ed: Parkes A.S.London:Longmans. Green. pp26-146.
- 159.SALISBURY RL, DUDLEY SD, WEISZ J. 1982. Effect of gonadotropic-releasing hormone on circulating levels of immunoreactive luteinizing hormone in fetal rats, *Neuroendocrinology* 35: 265-269.
- 160.SAMSON WK, BURTON KP, REEVES JP. 1981. Vasoactive intestinal peptide stimulates luteinizing hormone release from median eminence synaptosomes. *Regul. Pept.* 2: 253-264.

- 161.SAR M. 1983. Estradiol is concentrated in tyrosine hydroxylase containing neurons of the hypothalamus. *Science* 223: 938-940.
- 162.SAWYER C, HILLIARD J, KANEMATSU S, SCARAMUZZI R, BLAKE C. 1974. Effects of intraventricular infusion of norepinephrine and clopamine on LH release and ovulation in the rabbit. *Neuroendocrinology* 15:328-337.
- 163.SCHONFIELD WA. 1943. Primary and secondary sexual characteristics. Study of their development in males from birth through maturity with biometric study of penis and testis. *Am. J. Dis. Child* 65: 535-549.
- 164.SCHWANZEL-FUKUDA M, SILVERMAN AJ. 1980. The neurons terminalis of the guinea pig. A new luteinizing hormone releasing hormone neuronal system. *J. Comp. Neurol.* 191: 213-225.
- 165.SILVERMAN AJ. 1976. Distribution of luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) in the guinea pig brain. *Endocrinology* 99: 30-41.
- 166.SILVERMAN AJ. 1984. Luteinizing hormone releasing hormone containing synapses in the diagonal band and preoptic area of the guinea pig. *J. Comp. Neurol.* 227. 452-458.
- 167.SILVERMAN AJ. 1988.The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: Immunocytochemistry. En : Knobil, E., Neill J. Eds. *The Physiology of Reproduction*. New York Raven Press. pp 1283-1304.
- 168.SILVERMAN AJ, KREY LC. 1978. The luteinizing hormone releasing-hormone (LHRH) neuronal networks on the guinea pig brain. I. Intra-and extra-hypothalamic projections. *Brain Res.* 157: 233-246.
- 169.SILVERMAN AJ, WITKIN JW. 1985. Synaptic interactions of LHRH neurons in the guinea pig preoptic area. *J. Histochem. Cytochem.* 33: 66-72.
- 170.SILVERMAN AJ, KREY LC. ZIMMERMAN EA. 1979. A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neuronal networks in mammalian. *Biol. Reprod.* 20: 98-110.
- 171.SILVERMAN AJ, LIVNE Y, WITKIN JW. 1994. The Gonadotropin Releasing Hormone (GnRH) Neuronal System: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *Physiology of Reproduction*. 2a. Ed. Eds: E.Knobil, JD Neill. Raven Press New York. Cap 28, pp 1683-1709.
- 172.SMITH PE, ENGEL ET. 1927. Experimental evidence regarding the role of the anterior pituitary in the development and regulation of the genital system. *J. Anat.* 40: 159-217.
- 173.SMITH-WHITE S, OJEDA SR. 1981. Changes in ovarian LHRH receptor content during the onset of puberty in the female rat. *Endocrinology* 108: 347-349.
- 174.STEFENSON A, OWMAN Ch, SJOBERG N-O, SPORRONG B, WALLEES B. 1981.Comparative study of the Autonomic Innervation of the Mammalian Ovary, with particular regard to the follicular System. *Cell Tissue Res.* 215: 47-62.

- 175.SUWA S, MAESAKA H, MATSUI Y. 1974. Serum LH and FSH responses to synthetic LH-RH in normal infants, children and patients with Turner's syndrome. *Pediatrics* 54: 470-475.
- 176.SVENSSON KG, OWMAN Ch, SJOBERG N-O, SPORRONG B, WALLEES B.1975. Ultrastructural evidence for adrenergic innervation of the interstitial gland in the guinea-pig ovary. *Neuroendocrinology* 17: 40-47.
- 177.ter HAAR MB. 1976. Some observations on gonadotropin release in pregnant foetal guinea-pigs. *Annal. biol. Animale Biochimie Biophys.* 16: 413-419.
- 178.TerHAAR MB, HARRISON MA, PEDDIE MJ. 1976. Ovarian follicular development in immature guinea-pigs treated with progesterone, testosterone or oestradiol from birth. *J. Endocrinol.* 68: 31P.
- 179.THLIVERIS JA, CURRIE RW. 1980. Observations on the hypothalamo-hypophyseal portal vasculature in the developing fetus. *Am. J. Anat* 157:441-444.
- 180.TOUGARD C, TIXIER-VIDAL A. 1994. Lactotropes and gonadotropes. En: *The Physiology of Reproduction*. Eds.: E Knobil, JD Neill. 2a. Ed. Raven Press New York. Cap. 29, pp 1711-1747.
- 181.TOUGARD C, PICARD R, TIXIER-VIDAL A. 1977. Cytogenesis of immunoreactive gonadotropin cells in the fetal rat pituitary at light and electron microscopic levels. *Dev. Biol.* 58: 148-163.
- 182.TRESGUERRES JAF. 1992. *Fisiología Humana*. Interamericana, Mcraw-Hill. España pp 1060-1072.
- 183.TROUNSON AO, WILLIADSEN SM, MOOR RM. 1977. Reproductive function in prepubertal lambs: ovulation, embryo development and ovarian steoidogenesis. *J. Reprod. Fertil.* 49: 69-75.
- 184..UILENBROECK JTJ, van der LINDEN R. 1983. Changes in gonadotrophin binding to rat ovaries during sexual maturation. *Acta Endocrinol. (khh)* 103: 413-419.
- 185..URBANSKI HF, OJEDA SR. 1990. A role for N-methyl-aspartate (NMDA) receptors in the control of LH secretion and initiation of female puberty. *Endocrinology* 126: 1774-1776.
- 186.WALLEES B, EDVINSSON L, NYBELL G, OWMAN Ch, SJOBERG N-O. 1974. Amine-induced influence on spontaneous ovarian contractility in the guinea-pig and the cat. *Fertil. Steril.* 25: 602-611.
- 187.WAREMBOURG M. 1977. Radioautographic localization of oestrogen-concentrating cells in the brain and pituitary of the guinea-pig. *Brain Res.* 123:357-362.
- 188.WATSON RE, LANGUB MC, LANDIS JW. 1992. Further evidence that most luteinizing hormone releasing hormone neurons are not directly estrogen responsive. Simultaneous localization of lueinizing hormone releasing hormone and estrogen receptors in the guinea pig brain. *J. Neuroendocrinology* 4: 311-318.
189. WEINBERGER LM, GRANT FC. 1972. Precocious puberty and tumors of the hypothalamus. *Arch. Intern. Med.* 67: 762-769.

190. WEISS G, RIFKIN Y, ATKINSON LE. 1976. Induction of ovulation in premenarchal rhesus monkeys with human gonadotropin. *Biol. Reprod.* 14: 401-404.
191. WEISS G, DAIL WG, RATNER A. (1982). Evidence for direct neural control of ovarian steroidogenesis in rats. *J. Reprod Fert.* 65: 507-511.
192. WILDT L, MARSHALL G, KNOBIL E. 1980. Experimental induction of puberty in the infantile female Rhesus Monkey. *Science* 207:1373-1375.
193. WINTER JSA, FAIMAN C. 1990. Comparative aspects of animal and human puberty. En: *Control of the onset of puberty*. Eds: MM Grumbach, PC Sizonenko and ML Aubert. William & Wilkins USA. Cap. 8, pp 211-230.
194. WINTER JSA, FAIMAN C, REYES FI. 1977. Serum gonadotropin concentrations in agonal children and adults. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 35: 561-564.
195. WORTHINGTON CA, KENNEDY J. 1979. Ovarian response to exogenous hormones in six-week-old lambs. *Aust. J. Biol. Sci.* 32: 91-95.
196. WRAY S, GRANT P, GAINER E. 1989. Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86: 8132-8136.
197. WUTTKE W, HONMA K, LAMBERTS R, HOHN KG. 1980. The role of monoamines in female puberty. *Fed. Proc.* 39; 2378-2383.
198. WUTTKE W, GELATO M. 1976. Maturation of positive feedback action of estradiol and its inhibition by prolactin in female rats. *Annal. Biol. Animale Biochim. Biophys.* 16: 349-362.



# Effects of peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine administration on the mechanisms regulating puberty in the female guinea pig

L Riboni<sup>1</sup>, C Escamilla<sup>2</sup>, R Chavira<sup>3</sup> and R Domínguez<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Biología and <sup>2</sup>Bioterio Claude Bernard, Universidad Autónoma de Puebla, <sup>3</sup>Departamento de Biología de la Reproducción, Instituto Nacional de la Nutrición 'Salvador Zubirán' and <sup>4</sup>Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, IES-Zaragoza, UNAM, Mexico

(Requests for offprints should be addressed to L Riboni, AP 574, Puebla, Pue, Mexico)

## Abstract

The effects of peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine administration to newborn and 10-day-old female guinea pigs on puberty, ovulation and the follicular population were analysed. Peripheral sympathetic denervation beginning at birth resulted in the loss of ovarian norepinephrine content ( $0.95 \pm 0.1$  ng/mg wet tissue in untreated control animals vs non detectable in treated animals). Guanethidine administration to newborn or 10-day-old guinea pigs advanced puberty (age of vaginal opening:  $27 \pm 1.2$  days (newborn),  $26 \pm 1.7$  (10-day-old) vs  $37 \pm 0.7$  (control),  $P < 0.001$ ) and ovulation. The number of corpora lutea in control and denervated animals was similar ( $3.5 \pm 0.2$  vs  $3.3 \pm 0.3$ ). The relative weight (mg/100 g body weight) of the ovaries and adrenals in the denervated animals autopsied during the late follicular phase (24–48 h after vaginal opening) increased (ovaries:  $27.8 \pm 1.3$ ,  $28.9 \pm 3.0$  vs  $20.9 \pm 0.8$ ,  $P < 0.05$ ; adrenals  $36.4 \pm 1.4$ ,  $37.0 \pm 0.8$  vs  $31.6 \pm 1.5$ ,  $P < 0.05$ ), while the uterine weight diminished ( $179 \pm 13$ ,  $149 \pm 28$  vs  $292 \pm 20$ ). When the animals were killed during the late luteal phase (9–11 days after vaginal closure), the relative weight of the ovaries of newborn guanethidine-treated animals was higher than that of the control animals ( $21.4 \pm 1.7$  vs  $16.8 \pm 1.4$ ,  $P < 0.05$ ). The

mean number of follicles counted in the ovaries of denervated animals was significantly higher than in control animals ( $1736 \pm 230$  vs  $969 \pm 147$ ,  $P < 0.05$ ). The mean diameter of the follicles in the untouched control ovary in animals killed in the late follicular phase was significantly larger than from animals killed in the late luteal phase ( $263 \pm 3.9 \mu\text{m}$  vs  $248 \pm 3.0 \mu\text{m}$ ,  $P < 0.01$ ). The mean diameter of the follicles measured in the ovaries of denervated animals was significantly higher than in controls (animals treated from birth  $274 \pm 2.0 \mu\text{m}$  vs  $255 \pm 2.4$ ,  $P < 0.05$ ; animals treated from day 10,  $286 \pm 2.3 \mu\text{m}$  vs  $257 \pm 2.3$ ,  $P < 0.05$ ). When the mean diameter of the follicles in the left and right ovary of the untouched control was analysed, the follicular diameter in the left ovary was significantly larger than in the right ovary ( $309 \pm 6.0 \mu\text{m}$  vs  $214 \pm 3.9$ ,  $P < 0.01$ ); the response of the left and right ovaries to sympathetic denervation was the opposite. The results obtained in the present study suggest that ovarian innervation plays a role in the regulation of follicular growth, maturation and atresia which is not related to changes in steroid secretion by the ovary, but to other regulatory mechanisms.

*Journal of Endocrinology* (1998) **156**, 91–98

## Introduction

The participation of peripheral ovarian innervation in the regulation of ovarian functions in the adult and prepubertal animal is a controversial issue. According to Lara *et al.* (1990) and Flores *et al.* (1990), sympathetic chemical denervation induced by guanethidine administration to 7-day-old or newborn rats, results in a delay of puberty. Pharmacological administration of guanethidine in adults has demonstrated that it is a specific noradrenergic blocker which does not cross the haematoencephalic barrier (Oates 1995). Its administration to rats results in the destruction only of postganglionic sympathetic neurones (Johnson &

Manning 1984). The effects of guanethidine in rats has been explained by its actions as a false neurotransmitter (Boullin *et al.* 1966) and/or by neuronal destruction which involves a drug-induced, apparently cell-mediated, auto-immune attack on the sympathetic neurone (Manning *et al.* 1983). According to Johnson and Manning (1984), the immune response elicited by guanethidine administration resulting in the destruction of sympathetic neurones, is true only in rats. Based on the number of sympathetic neurones surviving after chronic guanethidine treatment, the sensitivity of the rat varies with the strain used.

According to Donovan (1990) 'the hormones physiologically active in controlling the onset of puberty in the

guinea pig still await identification'. It has been postulated that a major neuroendocrine change occurs in the female guinea pig between 10–15 days of age (Nass *et al.* 1984a). Then, ovarian steroids can stimulate luteinizing hormone (LH) release in the immature female guinea pig, but not until an age is reached near the normal time of the first ovulation (Nass *et al.* 1984b). The presence of antral follicles has been described in the ovaries of newborn guinea pigs (Peddie 1976). On days 7 to 28 of life, the number of antral follicles increases, in spite of follicle-stimulating hormone (FSH) and LH serum concentrations declining since birth and increasing only just before puberty at about 45 days of age (Donovan *et al.* 1975a,b).

We have shown previously that gonadotrophin or oestradiol administration to newborn female guinea pigs resulted in precocious puberty (D'Albora *et al.* 1974, Medero & Domínguez 1977).

By analysing the effects of sympathetic denervation induced by guanethidine administration to rats (Domínguez & Zipitriá 1980, Flores *et al.* 1990) and mice (Rosas *et al.* 1989), we have proposed that ovarian noradrenergic innervation plays a stimulatory role on the control of ovulation in adult rats, while during the prepubertal period its role is inhibitory (Flores *et al.* 1990).

Because guinea pig ovaries have a dense noradrenergic innervation, and because it has been suggested that nerves may exert a trophic influence on follicular development (Burden 1972), the goal of this study was to analyse the participation of sympathetic ovarian innervation in the prepubertal female guinea pig on the regulation of puberty. This was achieved by studying the effects of guanethidine treatment in newborn and prepubertal female guinea pigs on spontaneous ovulation and hormonal secretion. According to Johnson and Manning (1984), 'destruction of the sympathetic nervous system produced by chronic treatment with high doses of guanethidine has been observed only in the rat'. Treatment of adult guinea pigs (30 mg/kg/day guanethidine, intraperitoneally) for six weeks does not result in the destruction of sympathetic neurones (O'Donnell & Saar 1974).

## Materials and Methods

Fifty-seven female guinea-pigs were used. They were from the Hartley strain and were maintained in an artificially controlled lighted room (lights on from 0600 to 1900 h), with laboratory chow, alfalfa and water available *ad libitum*.

The animals were weaned at 10 days of age, and were observed for vaginal opening daily thereafter. Puberty is defined as the age of first vaginal opening (Carlevaro *et al.* 1969). In the adult female guinea pig, the oestrous cycle lasts 16–20 days, for 13–15 days of which the vagina is closed with a membrane (vaginal closure period). This membrane is lost for a period of 3–6 days (vaginal opening

period). The vaginal closure period corresponds to dioestrus and is characterised by high plasma levels of progesterone and FSH, and low plasma levels of oestradiol and LH, compared with the pro-oestrous-oestrous period (Croix & Franchimont 1975). The pro-oestrous-oestrous (pre- and postovulatory) period starts with the rupture of the vaginal membrane (vaginal opening) which lasts 3 to 6 days. During this period, an abrupt increase in FSH and oestradiol, followed by a peak in LH plasma levels has been described (Croix & Franchimont 1975). In our strain, the ability of the female to mate (behavioural oestrus), begins during the second day after vaginal opening. Based on these events, the time of autopsy was defined as the late follicular phase (24–48 h after vaginal opening) or as the late luteal phase (9–11 days after vaginal closure) (Buño *et al.* 1975).

Animals were allocated randomly to one of the following groups: (1) twenty-two females were used as an untouched control group. Sixteen were killed in the late follicular phase and six in the late luteal phase. (2) Twenty-six animals were injected subcutaneously (s.c.) with guanethidine sulphate (Sigma Chemical Company, St Louis, MO, USA) in saline (20 mg/kg, twice a week) beginning on the day of birth. Such a dose is similar to those used in humans for blood hypertension treatment (Oates 1995). Twelve animals were killed in the late follicular phase and fourteen in the late luteal phase. To analyse whether such a dose of guanethidine depletes noradrenaline completely from the ovaries, as has been shown for rats, three newborn guinea pigs were injected with guanethidine (20 mg/kg) twice a week, three doses distributed over 9 days, and four animals of the same age without treatment were used as controls. The animals were killed 24 h after the last injection of guanethidine. The ovaries were dissected, weighed and norepinephrine content was measured by high performance liquid chromatography (HPLC), following the procedure previously described (Chávez *et al.* 1994). The destruction produced by guanethidine in neonates is more rapid and more complete than in adult animals (Johnson & Manning 1984). (3) Twenty-three animals were injected (s.c.) with guanethidine (20 mg/kg, twice a week) beginning on day 10 of life. Seventeen were killed in the late follicular phase and six in the late luteal phase.

## Autopsy procedure

The animals were killed by bleeding under ether anaesthesia. The blood was allowed to clot and centrifuged at 3000 r.p.m.. The serum was stored at  $-20^{\circ}\text{C}$  until oestradiol and progesterone were measured in duplicate by specific radioimmunoassays following the methodology of Orczyk *et al.* (1974), using reagents and protocols provided by the Matched Reagent Programme of the Special Programme of Research, Development and Training in Human Reproduction of the World Health Organization

**Table 1** Body weight and relative weight (mg/100 g body weight) of the ovaries, uterus and adrenals in female guinea pig, controls and animals treated with guanethidine (GTD) (20 mg/kg) at birth or on day 10 of life and killed in the late follicular or the late luteal phase. Values are means  $\pm$  SEM.

Group	Body weight (g)	Ovaries (mg/100 g)	Uterus (mg/100 g)	Adrenals (mg/100 g)
<b>Late follicular phase</b>				
Control	327 $\pm$ 6.0	20.9 $\pm$ 0.8	292 $\pm$ 20	31.6 $\pm$ 1.5
GTD birth	261 $\pm$ 8.5*	27.8 $\pm$ 1.3*	179 $\pm$ 13*	36.4 $\pm$ 1.4*
GTD 10	248 $\pm$ 16*	28.9 $\pm$ 3.0*	149 $\pm$ 28*	37.0 $\pm$ 0.8*
<b>Late luteal phase</b>				
Control	448 $\pm$ 12.5	16.8 $\pm$ 1.4	242 $\pm$ 33	35.4 $\pm$ 2.2
GTD birth	405 $\pm$ 13.8	21.4 $\pm$ 1.7*	199 $\pm$ 24	40.3 $\pm$ 2.0
GTD 10	421 $\pm$ 6.1	20.6 $\pm$ 1.7	195 $\pm$ 14	39.5 $\pm$ 1.8

\* $P < 0.05$  compared with control.

(Geneva, Switzerland). The endocrine organs (ovaries, uterus and adrenals) were dissected and weighed on a precision balance. The ovaries were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin wax, serially sectioned at 10  $\mu$ m and stained with haematoxylin and eosin. The presence of fresh corpora lutea was accepted as evidence of previous ovulation.

#### *Morphometric analysis of the follicular distribution*

All the follicles present in each 100  $\mu$ m section were measured with the aid of an ocular micrometer, following Weibel's (1979) methodology. In brief, all follicles contained in the test area were measured, taking care that the follicles with a diameter larger than 450  $\mu$ m were measured only once. The follicles were classified as healthy or atretic based on the following characteristics: a follicle was considered atretic when either the oocytes showed obvious signs of degeneration or granulosa cells were present in the follicular antrum (Cruz & Domínguez 1992).

Data on the weight of endocrine organs, expressed as mg/100 g body weight, norepinephrine, oestradiol and progesterone concentrations, and the mean follicular diameter were analysed using variance analysis (ANOVA) followed by Tukey's test or by Student's *t*-test. Ovulation rate, expressed as the number of animals with corpora lutea in the ovaries/number of treated animals, was analysed by Fisher's exact probability test. The results of the follicular distribution were analysed using a Chi square test. A probability less than 5% was considered as significant.

## Results

The body weights of control animals killed in the late luteal phase were significantly higher than those killed in

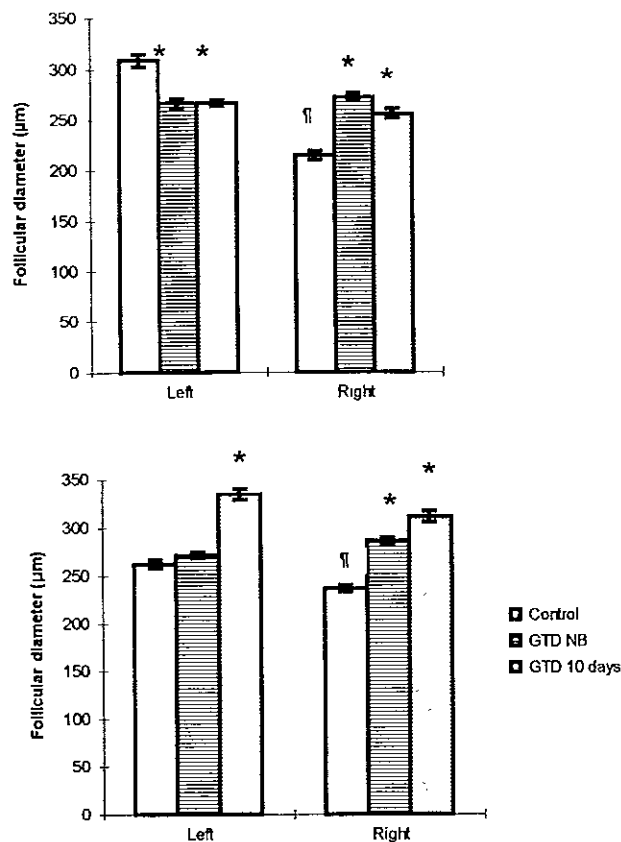
the late follicular phase. The relative weight (mg/100 g body weight) of the ovaries was higher in control animals killed in the late follicular phase than those killed in the late luteal phase (Table 1).

The ovarian norepinephrine concentration of intact control animals was 0.95  $\pm$  0.1 ng/mg wet tissue, while in guanethidine-treated animals it was below the detection limit of the method (50 pg).

The age of vaginal opening in animals denervated at birth or on day 10 of life was significantly advanced (treated at birth, 27  $\pm$  1.2 days; treated on day 10, 26  $\pm$  1.7 vs control, 37  $\pm$  0.7;  $P < 0.001$ , ANOVA followed by Tukey's test). In guanethidine (GTD)-treated animals killed in the late follicular phase, the weight of the ovaries and adrenals was higher than in the controls, while the weight of the uterus was significantly lower. When the animals were killed in the late luteal phase, the weight of the ovaries was significantly higher in the newborn denervated female than in the female controls. No differences in the weights of the uterus and adrenals were observed (Table 1).

The histological analysis of the ovaries of all animals, control and guanethidine-treated, killed in the late luteal phase showed the presence of corpora lutea, but none were present in the ovaries of the animals killed in the late follicular phase. The number of corpora lutea present in the ovaries in control and denervated animals was similar (control, 3.3  $\pm$  0.3 vs guanethidine-treated, 3.5  $\pm$  0.2, Mann-Whitney U test).

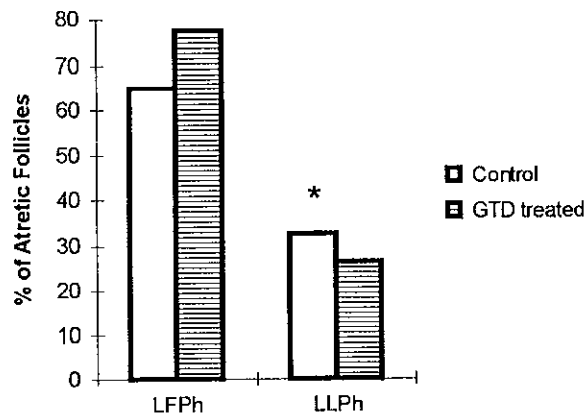
The serum oestrogen concentrations in newborn or 10-day-old guanethidine-denervated animals killed in the late follicular phase were similar to the levels measured in control animals (78.4  $\pm$  6.7 (newborn); 82.33  $\pm$  7.8 (10-day-old) vs 94.39  $\pm$  5.0 (control) pg/ml), while the serum progesterone concentrations were significantly higher (1.97  $\pm$  0.4; 1.47  $\pm$  0.2 vs 0.33  $\pm$  0.2 ng/ml;  $P < 0.01$ , Student's *t*-test). When the animals were killed in the late



**Figure 4** Follicular diameter ( $\mu\text{m}$ ) of the left and right ovaries of control, newborn (GTD NB) and 10-day-old (GTD 10 days) guinea pigs killed in the late follicular phase (LFP; upper panel) or the late luteal phase (LLP; lower panel). Values are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.01$  compared with proper control;  $\dagger P < 0.01$  compared with left control ovary (ANOVA followed by Tukey's test).

follicular phase, was significantly smaller than in controls. When the animals were killed in the late luteal phase, the mean diameter of the healthy follicles of the ovaries of denervated animals was significantly larger than in control animals (Fig. 3, upper panel). Differences in the mean follicular diameter of the atretic follicles of denervated and control guinea pigs killed in the late follicular phase were not observed. When the animals were killed during the late luteal phase, the mean diameter of the atretic follicles in the ovaries of denervated animals was significantly larger than in control animals (Fig. 3, lower panel).

When the mean diameter of the follicles in the left and right ovaries of the control animals was analysed, the follicular diameter in the left ovary was significantly greater than in the right ovary. The response of the left and right ovaries to noradrenergic denervation was the opposite. In the left ovary, the follicular diameter was smaller than controls, whereas in the right ovary the diameter of the denervated ovary was always greater than in controls (Fig. 4).



**Figure 5** Percentage of atretic follicles measured in the ovaries of control and guanethidine (GTD)-treated guinea pigs killed during the late follicular phase (LFP) or the late luteal phase (LLP) \* $P < 0.05$  compared with control group (ANOVA followed by Tukey's test)

The percentage of atretic follicles measured in the ovaries of control and guanethidine-treated guinea pigs killed during the late follicular phase was higher than for those killed in the late luteal phase (Fig. 5). Significant differences in the incidence of atresia between control and denervated animals were not observed; however, the number of atretic follicles was always higher in denervated compared with control guinea pigs.

## Discussion

In addition to the general effects resulting from the sympathetic-peripheral denervation induced by guanethidine administration, the present results agree with the notion that in prepubertal females, ovarian-sympathetic (noradrenergic?) innervation plays an inhibitory, modulatory role in the reactivity of the ovaries to endogenous gonadotrophins (Flores *et al.* 1990). The possibility that peripheral denervation induced by guanethidine results in an alteration of blood pressure seems unlikely since such treatment in humans produces orthostatic hypotension, which is readily compensated (Oates 1995).

Both Flores *et al.* (1990), who administered 20 mg/kg guanethidine sulphate to newborn rats and Lara *et al.* (1990) who used 50 mg/kg guanethidine monosulphate, observed a delay in puberty. The differences observed in the results in guanethidine-treated rats (Flores *et al.* 1990, Lara *et al.* 1990) and guinea pigs (present results) appear to reflect the differences in the amount of noradrenergic innervation in the two species (Burden 1972). There is evidence that chronic guanethidine treatment of adult guinea pig, adult and newborn cats, adult mice, adult toads, rabbits, hamsters, gerbils and chickens does not result in neuronal death (Johnson & Manning 1984).

ovulation as measured by the presence of fresh corpora lutea in the ovaries.

The increase in the adrenal weight of guanethidine-treated animals suggests that noradrenergic peripheral innervation plays a role in the regulation of the response of this tissue to other endocrine organs besides the ovaries.

There is some evidence that the right and left ovary respond differently. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary have been described in the human (Potashnik *et al.* 1987), pig (Hunter *et al.* 1985) and monkey (Morse & Van Wagenen 1936). In the rat, such differences are related to the number of ova shed by the right and left ovary, the compensatory ovarian hypertrophy following hemiovariectomy, and its dependence on ovarian innervation (Ayala & Domínguez 1988), in spite of the fact that the concentration of noradrenaline in the right and left ovaries is similar (Chávez *et al.* 1994). The differences in the number of follicles and mean diameter measured in the right and left ovary and the opposite response to peripheral denervation by healthy and atretic follicles could be related and would reflect differences in the neural information reaching each ovary.

The results obtained in this study suggest that ovarian innervation plays a role in the regulation of follicular growth, maturation and atresia which is not related to changes in steroid secretion by the ovary but to other regulatory mechanisms, for example, follicular vascularization (Greenwald 1993). Because such regulatory mechanisms present some asymmetry between the left and right ovary, it is possible that the neural information arises from a lateralized portion of the central nervous system, as has been shown previously in the rat (Cruz *et al.* 1990, Domínguez-González & Chávez 1993, Ayala *et al.* 1994).

### Acknowledgements

This work was supported by CONACYT, grant 2343P-M, PUIS, DGAPA, grant 210893 and PADEP, grant 500307.

### References

Aberdeen J, Corr L, Milner P, Lincoln J & Burnstock G 1990 Marked increases in calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the developing rat following long-term sympathectomy with guanethidine *Neuroscience* **35** 175–184.

Aguado LI, Petrovic SL & Ojeda SR 1982 Ovarian  $\beta$ -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution and coupling to steroidogenic responses *Endocrinology* **110** 1124–1132.

Ayala ME & Domínguez R 1988 Ovulatory response to the sequential administration of follicle stimulating hormone and human chorionic gonadotrophin by autografted ovary in unilaterally ovariectomized adult rat with peripheral denervation by guanethidine treatment. *La Revista de Investigación Clínica México* **40** 149–155.

Ayala ME, Rosas P & Domínguez R 1994 Different effects of unilateral and bilateral lesions of the dorsal raphe nucleus on puberty and first ovulation *Brain Research Bulletin* **40** 149–155.

Boullin DJ, Costa E & Brodie BB 1966 Discharge of tritium-labeled guanethidine by sympathetic nerve stimulation as evidence that guanethidine is a false transmitter. *Life Sciences* **5** 803–808.

Buño W, Carlevaro E, Riboni L, D'Albora H, de los Reyes L, Zapitúa D & Domínguez R 1975 Hysterectomy of the newborn guinea pig: subsequent effects on the oestrous cycle and life span of the corpora lutea. *Journal of Endocrinology* **66** 233–237.

Burden HW 1972 Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig *Journal of Anatomy* **133** 455–462.

Burden HW & Lawrence IE Jr 1977 Effects of denervation on the localization of  $\Delta$ -3 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat ovary during pregnancy *Acta Anatomica* **97** 286–290.

Carlevaro E, D'Albora H, Riboni L, de los Reyes L, Domínguez R & Buño W 1969 Effects of hemispaying on guinea pigs injected with testosterone on the first day of life. *Acta Physiologica Latinoamericana* **19** 315–323.

Chávez R, Morales L, González ME & Domínguez R 1994 Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: temporal studies *Medical Science Research* **22** 789–790.

Croix D & Franchimont P 1975 Changes in the serum levels of the gonadotrophins, progesterone and estradiol during the estrous cycle of the guinea pig. *Neuroendocrinology* **19** 1–11.

Cruz ME & Domínguez R 1992 Modifications in the follicular compartment of the ovaries of adult rats with a unilateral lesion of the hypothalamus. *Medical Science Research* **20** 939–941.

Cruz ME, Morán JL, Jaramillo LP & Domínguez R 1990 Differential effects of a unilateral hypothalamic lesion on ovulation and compensatory ovarian hypertrophy in hemiovariectomized adult rats *Journal of Endocrinology* **124** 37–41.

Curry TE Jr, Lawrence IE & Burden HW 1984 Ovarian sympathectomy in the guinea pig II. Effects on follicular development during the prepubertal period and following exogenous gonadotropin stimulation. *Cell and Tissue Research* **236** 593–596.

D'Albora H, Carlevaro E, Riboni L, de los Reyes L, Zapitúa D & Domínguez R 1974 Advanced puberty in female guinea pigs treated with human chorionic gonadotrophin (hCG) or testosterone enantate (ET) at birth. *Hormone Research* **5** 344–350.

Daniel SAJ & Armstrong DT 1983 Involvement of estrogens in the regulation of granulosa cell aromatase activity *Canadian Journal of Physiology and Pharmacology* **61** 507–511.

Domínguez R & Zapitúa D 1980 Longterm effects of guanethidine administration on the ovulatory response of the rat *IRCS Medical Science* **8** 352.

Domínguez-González A & Chávez R 1993 Asymmetric effects of unilateral lesions in the midbrain central gray matter on ovulation in the adult female rat. *Medical Science Research* **21** 513–514.

Donovan BT 1990 Puberty in the guinea pig and rabbit. In *Control of the Onset of Puberty*, Ch 5, pp 143–155. Eds MM Grumbach, PC Sizonenko & ML Auberts. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.

Donovan BT, ter Haar MB, Lockhart AN, Mackinnon PCB, Mattock JM & Peddie MJ 1975a Changes in the concentration of luteinizing hormone in plasma during development in the guinea-pig. *Journal of Endocrinology* **64** 511–520.

Donovan BT, ter Haar MB, Lockhart AN & Peddie MJ 1975b Changes in the concentration of follicle-stimulating hormone in plasma during development in the guinea-pig. *Journal of Endocrinology* **64** 521–528.

Dyer CA & Erickson GF 1985 Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotrophin-stimulated androgens biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* **16** 1645–1652.

Flores A, Ayala ME & Domínguez R 1990 Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation of ovulation in pubertal and adult rat? *Medical Science Research* **18** 817–818.

Greenwald GS 1993 How does daily treatment with hCG induce superovulation in the cyclic hamster? *Biology of Reproduction* **48** 133–142.

# Advancement of puberty in ovariectomised and hemiovariectomised female guinea pigs after ovarian autograft and treatment with gonadotrophins

Laura Riboni<sup>1</sup>, Carlos Escamilla<sup>2</sup> and Roberto Domínguez<sup>3</sup>

<sup>1</sup>Escuela de Biología and <sup>2</sup>Bioterio Claude Bernard. Universidad Autónoma de Puebla, <sup>3</sup>Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México

**Keywords:** Puberty, ovulation, gonadotrophins, ovariectomy.

**Introduction:** According to Mills and Reed [1] advanced puberty in the female guinea pig can be obtained by exogenous gonadotrophin stimulation only when the injection is given around a 'crucial period' very close to the spontaneous puberty.

We have previously shown, however, that new-born guinea-pigs treated with human chorionic gonadotrophin (hCG) or testosterone enanthate advanced the age of vaginal opening, and corpora lutea were present into the ovaries [2]. Hemiovariectomy in the adult guinea-pig is followed by compensatory hypertrophy of the remaining ovary, while the same treatment performed on prepubertal animals did not result in the compensatory growth of the *in situ* ovary [3].

There is evidence that some of the mechanisms regulating ovarian function in prepubertal and adult rats are different [4]. We thus conducted the present study to investigate whether follicle stimulating hormone (FSH) and human chorionic gonadotrophin (hCG) given to prepubertal hemiovariectomised or castrated guinea-pigs with autografted ovaries (surgically denervated) was able to modify the time at which was reached.

**Materials and methods:** Female newborn guinea-pigs from our institute's own mixed stock were housed in a light controlled room (05:00 to 19:00 h lights on) and laboratory chow, alfalfa and water were given *ad libitum*. Vaginal opening was recorded daily in all animals from day 20. All the animals were autopsied between 9 and 11 days after the first vaginal opening [2]. The animals were allotted randomly to the following groups:

Group 1: Twelve intact guinea-pigs were followed from birth to the first vaginal opening.

Group 2: Nine guinea-pigs were injected subcutaneously on day 15 of life with ovine FSH (Bayer, México City) (20 iu) 48 h after with FSH (20 iu) and 48 h later with hCG (Bayer) (10 iu).

Group 3: Twenty-seven 15 day old animals were hemispayed (left ovary) under ether (Baker, México City) anaesthesia; in 21 guinea-pigs that extirpated ovary was implanted under the skin of the back; nine of them were injected with FSH and hCG as in Group 2.

Group 4: Eighteen animals were ether anaesthetised, spayed and both ovaries implanted under the skin of the back. Eight of them were injected with FSH and hCG as in Group 2.

The animals were killed by bleeding under ether anaesthesia. The *in situ* ovaries and uterus were dissected out and weighed. The grafted ovaries were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin wax, serially sectioned at 10 µm and stained with haematoxylin and eosin. The presence of fresh

corpora lutea in the ovaries was accepted as evidence of a previous ovulation.

Compensatory ovarian hypertrophy (COH) was calculated using the following procedure: COH = [weight of the *in situ* ovary - mean of the weight of control's left ovary/mean of the weight of control's left ovary] × 100.

Data on weight of the ovaries and uterus were analysed by analysis of variance followed by Tukey's test. Compensatory ovarian hypertrophy was analysed by Kruskal-Wallis test. A probability less than 5% was accepted as significant.

**Results and discussion:** Vaginal opening was advanced by FSH-hCG administration ( $41 \pm 1.8$  days vs  $55 \pm 1.7$ ,  $p < 0.01$ ). No differences in the age of vaginal opening between hemispayed-autografted and castrated-autografted animals were observed. The sequential administration of FSH-hCG did not modify it.

There were no significant differences in the weight of ovaries and uterus between FSH-hCG or control animals (ovaries  $13.8 \pm 1.6$  vs  $15.2 \pm 0.8$ ; uterus  $230 \pm 28$  vs  $261 \pm 18$ ). The increase in the weight of the ovaries in hemispayed guinea-pigs with and without ovarian-autograft was similar. Differences in the weight of the uterus of castrated-autografted and hemispayed animals were not observed (Table 1).

Because there were no differences in the weight of the ovary and COH of hemispayed animals with and without ovarian-autograft, the sequential administration of FSH-hCG was done only in those animals with an ovarian autograft. The weight of the remaining ovary and uterus in hemispayed-autografted animals were not modified by the administration of gonadotrophins (ovaries  $13.7 \pm 1.6$  vs  $11.0 \pm 0.7$ ; uterus  $268 \pm 28$  vs  $204 \pm 30.6$ ). The COH in gonadotrophin-treated animals was not significantly higher than in the non-treated ones ( $87.5 \pm 22$  vs  $49.8 \pm 8.7$ ).

There were no signs of ovulation, fresh or old corpora lutea, in the *autografted ovaries* in both gonadotrophin treated and non-treated animals. The *in situ* ovary had fresh corpora lutea and follicles of different sizes. In the bilaterally ovariectomised animals, the autografted ovaries

Table 1: Ovarian and uterine weight (mg/100 g), and compensatory ovarian hypertrophy (COH) of hemispayed, hemispayed and autografted, spayed and autografted prepubertal guinea pigs (means ± SEM).

Group	n	Right ovary	COH	Uterus
Control	12	$7.9 \pm 0.5$	-	$261 \pm 18$
Hemispayed	6	$11.0 \pm 0.7^*$	$49.8 \pm 8.7$	$197 \pm 8.8$
Hemispayed + A	12	$12.3 \pm 0.8^*$	$68.6 \pm 10.3$	$270 \pm 28$
Spayed + A	10	-	-	$204 \pm 30.6$

As compared with control group, \* $p < 0.001$ . (ANOVA followed by Tukey's test).

# Peripheral sympathetic denervation provoked by guanethidine injection results in the advancement of ovulation, induced by sequential gonadotrophin treatment, in prepubertal female guinea pigs

L. Riboni<sup>1</sup>, E. Chávez<sup>1</sup> and R. Domínguez<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Biología de la Reproducción, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla, México*

<sup>2</sup>*Biology of Reproduction Research Unit, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México*

**Keywords:** Ovulation, guanethidine sulfate, gonadotrophin

**Abstract:** There is evidence that the sympathetic innervation of the ovary plays a role in regulating ovulation. We analysed the possibility that the ovarian sympathetic innervation modulates the effects of gonadotrophins on ovulatory ability in the prepubertal guinea pig. Injection of guanethidine sulfate into newborn female guinea pigs resulted in the advancement of the age of vaginal opening, as compared with untouched control animals ( $27 \pm 9$  vs  $37 \pm 0.9$  days,  $p < 0.05$ ). 24–48 h after the vaginal opening, neither untouched control nor guanethidine treated animals showed signs of ovulation (presence of fresh corpora lutea in the ovaries). The sequential injection of 10 IU of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG), followed 56 h later by 10 IU of human chorionic gonadotrophin (hCG) into 10 day-old guinea pigs resulted in the advancement of the age of vaginal opening ( $22 \pm 2.3$  days vs  $37 \pm 0.9$  days,  $p < 0.05$ ). When PMSG-hCG was administered to guanethidine-treated animals, the age of vaginal opening was significantly advanced as compared with PMSG-hCG-treated animals ( $17 \pm 0.8$  vs  $22 \pm 2.3$  days,  $p < 0.05$ ). Almost all animals treated with PMSG-hCG, denervated or not, had fresh corpora in their ovaries. Differences in the number of fresh corpora lutea between denervated and non-denervated guinea pigs treated with PMSG-hCG were not observed. These results indicate that the sensitivity of the follicles to gonadotrophins is modulated in an inhibitory way by noradrenergic innervation.

**Introduction:** In the rat, the first postnatal hormonal event of significance for the initiation of puberty is the elevation of serum follicle stimulating hormone (FSH) plasma levels during the second week of life. These elevated FSH levels play a role in the recruitment of follicles destined to ovulate at the time of puberty [1]. In the guinea pig, fetal plasma gonadotrophins are highest in mid-gestation and decrease toward term [2,3]. This rise in fetal gonadotrophins may be responsible for the presence of antral follicles in the female guinea pig ovary at birth. [4]

Rowlands and Parkes [5] point out that in the immature guinea pig all gonadotrophins tend to evoke a similar pattern of response: the production of follicles, oestrous changes in the uterus and luteinisation without ovulation. We have previously shown that FSH-human chorionic gonadotrophin (hCG) administration to prepubertal guinea pigs advanced the vaginal opening and ovulation [6]. We also found that peripheral noradrenergic denervation induced by guanethidine administration to the new-born female guinea pig has the same effect. [7]

Based on these results, it was of interest to determine whether noradrenergic peripheral denervation by guanethidine results in the increase of follicular responsiveness to gonadotrophins. To test the hypothesis, we analysed the effects of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG)-hCG injected into prepubertal guinea pigs (denervated or not with guanethidine from birth) on the age of the first vaginal opening and ovulation.

**Materials and methods:** 40 new-born female guinea pigs of the Hartley strain were obtained from the Bioterio Claude Bernard, BUAP, Puebla, Pue. They were housed in a light controlled room (0.600 to 19.00 h lights on) and laboratory chow, alfalfa and water were given *ad libitum*.

The animals were weaned at 10 days of age and vaginal opening was recorded daily there after. All autopsies were performed between 24 and 48 h after the first vaginal opening. The animals were allotted randomly to the following groups: Group 1, 16 intact guinea pigs followed from birth to the first vaginal opening; Group 2, beginning on the day of birth, 12 animals were injected subcutaneously with guanethidine sulfate (Ciba-Geigy, México DF, México) in saline ( $20 \text{ mg kg}^{-1}$ , twice a week; Group 3, six 10-day old guinea pigs were injected subcutaneously with 10 IU of PMSG (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo., USA) in saline and 56 h after, with 10 IU of hCG (Sigma); and Group 4, six guinea pigs injected with guanethidine from birth (as in group 2), on day 10 of life, treated with PMSG-hCG, as group 3.

The animals were killed by bleeding under ether (Baker, Xalostoc, Estado de México, México) anaesthesia. The ovaries and uteri were dissected and weighed on a precision balance. The ovaries were fixed in Bouin's fluid, embedded in paraffin wax, serially sectioned at  $10 \mu\text{m}$  and stained with haematoxylin and eosin. The presence of fresh corpora lutea was accepted as evidence of previous ovulation.

Data on the weight of endocrine organs, expressed as  $\text{mg}/100 \text{ g}$  and body weight, were expressed as means  $\pm$  SEM and examined by analysis of variance (ANOVA) followed by Tukey's test. Age of vaginal opening was compared by the Kruskal-Wallis test followed by the Mann-Whitney test;  $p$  values  $< 0.05$  were accepted as significant.

**Results and discussion:** In comparison with the untreated control group, the age of vaginal opening was advanced in all of the experimental groups. The highest significance was in the group denervated from birth and treated with PMSG-hCG at age 10 days (Table 1).

The body weight was lower in all treated groups, reflect-

Table 1: Age of vaginal opening (days), body weight (g) and relative weight (mg/100 g of body weight) of the ovaries and uterus of female guinea pig, control, treated with guanethidine sulfate at birth, treated with PMSG-hCG or denervated with guanethidine from birth and treated with PMSG-hCG on day 10 of life, killed 24–48 h after first vaginal opening (means  $\pm$  SEM).

Group	No. of animals	Age of vaginal opening	Body weight	Ovaries	Uterus
Control	16	37 $\pm$ 0.9	327 $\pm$ 5.8	20.9 $\pm$ 1.9	292 $\pm$ 20
G1D NB	12	27 $\pm$ 1.9	261 $\pm$ 8.5	28.7 $\pm$ 1.3*	179 $\pm$ 13*
PMSG-hCG	6	22 $\pm$ 2.3	265 $\pm$ 23.7	26.0 $\pm$ 1.9 <sup>†</sup>	278 $\pm$ 20
G1D NB + PMSG-hCG	6	17 $\pm$ 0.8	219 $\pm$ 9.7	39.4 $\pm$ 4.6*#*	236 $\pm$ 19#

\*As compared with untouched control group,  $p < 0.05$  (ANOVA) followed by Tukey's test

†As compared with denervated group,  $p < 0.05$  (ANOVA) followed by Tukey's test

#As compared with gonadotropin-treated group,  $p < 0.05$  (ANOVA) followed by Tukey's test

ing the earlier age of the autopsy (Table 1). There were no significant differences in the body weight of untreated control and denervated or gonadotropin-treated animals of the similar age (27-day old control 277  $\pm$  5.5; denervated animals 261  $\pm$  8.5; gonadotropin-treated 265  $\pm$  23; 17-day old control 204  $\pm$  5.1; denervated-gonadotropin treated 219  $\pm$  9.7).

The weights of the ovaries were higher in denervated animals than in the untreated control group. When gonadotropins were injected into denervated animals, the increase in ovarian weight reached the highest value (Table 1). The weight of the uterus was lower in denervated animals than in control ones. In gonadotropin-treated animals the weight was similar to control ones, while in denervated-gonadotropin treated animals it was higher than in denervated ones, but did not reach the values in control and gonadotropin-treated animals.

Histological analysis of the ovaries revealed that both control guinea pigs and denervated animals killed 24–48 h after vaginal opening failed to ovulate. Both gonadotropin-treated and denervated-gonadotropin-treated animals ovulated (5/6 and 5/6); differences in the mean of the number of corpora lutea were not observed (gonadotropin-treated animals 2  $\pm$  0.7 vs 2.4  $\pm$  0.5 in denervated-gonadotropin-treated animals).

The corpora lutea in the ovaries of denervated, gonadotropin-treated guinea pigs were normal. In the majority of the medium and large follicles, hypertrophy of the theca was commonly observed, as well as interstitial-theca cells in the medulla. In the four ovaries which did not show fresh corpora lutea (ovulation did not occur), almost all atretic follicles were luteinised. They could be differentiated from normal corpora lutea only by their smaller diameter, the egg retained in the follicle and granulosa cells in their periphery. In the connective tissue of the medulla, neuronal bodies were present.

These results suggest that hCG-LH administration to animals with follicular development enhanced by PMSG-injection induces a real advancement of puberty, since the ovaries of control animals did not contain corpora lutea at autopsy. Such findings agree with those of Donovan *et al.* [3] and Nass *et al.* [8] who observed that the first spontaneous ovulation in the guinea pig is delayed seven to 10 days and is related to vaginal opening.

Advancement of the age of vaginal opening in guanethidine-denervated guinea pigs agrees with previous results, and suggests that oestrogen secretion was advanced because the number of oestrogen secretory-follicular units was higher [7]. Because the ages of vaginal opening and ovulation were earlier in denervated animals stimulated with PMSG-hCG, and the weight of the ovaries was higher than in control and gonadotropin-treated animals, we suggest that the sensitivity of the follicles to gonadotropins is

modulated in an inhibitory way by noradrenergic innervation. This interpretation is supported by the work of Curry *et al.* [9] who found that ovarian unilateral denervation in 20-day old guinea pigs, induced by local injection of 6-hydroxy dopamine, results in an increase of the number of medium and large follicles. The fact that the number of atretic follicles is higher in guanethidine-treated animals [7], and that the incidence of atresia is higher in denervated-gonadotropin treated animals, support the idea of an inhibitory-modulator role of noradrenergic ovarian innervation on follicular functions.

The low weight of the uterus in denervated animals, whether treated with gonadotropins or not, suggests that noradrenergic innervation plays a stimulatory-modulator role in the response of the uterus to oestrogen. In the intact guinea pig, the ovarian-noradrenergic innervation would not regulate oestrogen secretion in a stimulatory way, because the weight of the uterus in denervated-gonadotropin treated animals was higher than in denervated ones. *In vitro* studies indicate that overstimulation of the ovarian  $\beta$ -receptors results in increases in progesterone and androgen secretion [10].

The presence of neurones in the medulla of the ovary agrees with the results of D'Albora and Barcia [11] in the rat, and Les Dees *et al.* [12] in the monkey. It could be the morphological basis for the origin of the hypothetical neural pathway transmitting information from the ovary to the central nervous system, as previously postulated [13].

- Ojeda, S.R., Aguado, L.I. and Smith-White, S. 1983. *Neuroendocrinology*, **37**, 306–313
- Donovan, B.T. ter Haar, M.B., MacKinnon, E.C.B. *et al.* 1975 *J Endocrinol.*, **64**, 511–520
- Donovan, B.T. ter Haar, M.B., Lockhart, A.N. and Peddie, H.J. 1975. *J Endocrinol.*, **64**, 521–528
- Peddie, M.J. 1980 *J Endocrinol.*, **84**, 323–331
- Rowlands, I.W. and Parkes, A.S. (1966). In: Parkes A.S. (ed), *Marshall's Physiology of Reproduction*, Vol. 3, pp. 26–146 Longmans Green, London
- Riboni, L., Escamilla, C. and Domínguez, R. 1995. *Med. Sci. Res.*, **23**, 307–308
- Riboni, L. and Domínguez, R. 1995. In: *Life Cycle of the Ovarian Follicle*, p. 43 Sero Symposia USA Inc Fort Lauderdale, Fla.
- Nass, T.E., Teresawa, E.I., Dierschke, D.J. and Goy, R.W. 1984. *Endocrinology*, **115**, 227–232
- Curry, T.E. Jr. Lawrence, I.E. Jr and Burden, H.W. 1984. *Cell Tiss. Res.*, **236**, 593–596
- Dyer, C.A. and Erickson, G.F. 1985. *Endocrinology*, **116**, 1645–1652
- D'Albora, H. and Barcia, J.J. 1996. *Neuroscience Lett.*, **205**, 65–67
- Les Dees, W., Himey, J.K., Schulte, T.D. *et al.* 1995. *Endocrinology*, **136**, 5760–5768
- Domínguez, R. and Riboni, L. 1971. *Neuroendocrinology*, **7**, 164–171

Supported by CONACYT grant IN 2343 P-M. PADEP grant 500308 and PUIS

Reprint requests to Dr L. Riboni, AP 574 Puebla, Pue, México.

Paper received 14th April, 1997, amended 31st May 1997



always showed corpora lutea. No histological differences were observed between animals with and without gonadotrophin administration.

The present results do not agree with those of Mills and Reed [1], and suggest that in the prepubertal female guinea-pig it is possible to advance puberty, measured by the age of vaginal opening and ovulation, by hormonal stimulation or ovarian manipulation. The advance of puberty induced by the sequential administration of FSH and hCG probably reflects the increase of the initial secretion of oestrogens. According to Peddie [5], at day 15 of age the guinea pig displays a wave of follicular atresia. Since in the present study FSH was injected into 15 day-old animals, it is possible that the follicular atresia was blocked by the hormonal treatment [6]. The advanced puberty could be the result of an increase in oestrogen secretion which triggers puberty. This assumption is supported by the normal weight of the uterus. These results suggest that the critical period in the guinea-pig is not as absolute as was postulated [1].

The failure of ovulation in the ovaries autografted in hemispayed animals agrees with similar observation in prepubertal and adult rats [7]. Such results have been interpreted by the lack of innervation in the autografted ovary and the

normal innervation in the *in situ* ovary, explaining the failure of ovulation by the ovarian autograft and the hypertrophy of the *in situ* ovary [7]. In castrated animals, both autografted ovaries are only under endogenous gonadotrophin control. In both the guinea-pig and the rat, there is evidence of the participation of ovarian adrenergic innervation in the control of follicular growth [8].

1. Mills, P.G. and Reed, M. 1971. *J. Endocrin.*, **50**, 329-337
2. D'Albora, H., Calevaro, E., Riboni, L. et al. 1974. *Hormone Res.*, **5**, 344-350
3. Donovan, B.T. and Lockhart, A.N. 1972. *J. Endocrin.*, **57**
4. Flores, A., Ayala, M.E. and Domínguez, R. 1990. *Med. Sci. Res.*, **18**, 817-818
5. Peddie, M.J. 1980. *Endocrin.*, **84**, 323-331
6. Hirshfield, A.N. 1983. *Biol. Reprod.*, **28**, 271-278
7. Domínguez, R. and Riboni, L. 1971. *Neuroendocrinology*, **7**, 164-170
8. Curry, T.E., Lawrence, I.E. and Burden, H.W. 1984. *Cell Tissue Res.*, **236**, 593-596

Supported by PEDEP, DGAPA grant IN210893 and PUIS, UNAM.

Reprint requests to: Dr L. Riboni, AP 574, Puebla, Puc, México.

Paper received: 21st December, 1994; amended 24th February, 1995.

- Greenwald GS & Roy SK 1994 Follicular development and its control. In *The Physiology of Reproduction*, ch 12, pp 629–724. Eds E Knobil & JD Neil. New York: Raven Press Ltd.
- Hunter RHF, Cook B & Baker TG 1985 Intersexuality in five pigs, with particular reference to estrous cycle, the ovotestis, steroid hormone secretion and potential fertility. *Journal of Endocrinology* **106**: 233–242.
- Johnson EM & Manning PT 1984 Guanethidine-induced destruction of sympathetic neurones. *International Review of Neurobiology* **25**: 1–37.
- Lara HE, McDonald JK, Ahmed CE & Ojeda SR 1990 Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* **127**: 2199–2209.
- Manning PT, Powers CW, Schmidt RE & Johnson Jr EM 1983 Guanethidine-induced destruction of peripheral sympathetic neurons occurs by an immune-mediated mechanism. *The Journal of Neuroscience* **4**: 714–724.
- Madero M & Domínguez R 1977 Induction of precocious puberty in newborn female guinea-pigs by a positive feedback action of estrogens. *Hormone Research* **8**: 224–230.
- Mills PG & Reed M 1971 The onset of first oestrus in the guinea-pig and the effects of gonadotrophins and oestradiol in the immature animal. *Journal of Endocrinology* **50**: 329–337.
- Mione MC, Cavanagh JFR, Kirkpatrick KA & Burnstock G 1992 Plasticity in expression of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in ganglia and fibres following guanethidine and/or capsaicin denervation. *Cell and Tissue Research* **268**: 491–504.
- Morse AM & Van Wageningen G 1936 Observations upon ovulation in primates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **32**: 823–832.
- Nass TE, Teresawa E, Dierschke DJ & Goy RW 1984a Developmental changes in luteinizing hormone secretion in the female guinea pig. I. Effects of ovariectomy, estrogen, and luteinizing hormone releasing hormone. *Endocrinology* **115**: 220–226.
- Nass TE, Teresawa E, Dierschke DJ & Goy RW 1984b Developmental changes in luteinizing hormone secretion in the female guinea pig. II. Positive feedback effects of ovarian steroids. *Endocrinology* **115**: 227–232.
- Oates JA 1995 Antihypertensive agents and the drugs therapy of hypertension. In *Goodman and Gilman: The Pharmacological Basis of Therapeutics*, edn 9, ch 33, pp 780–808. Eds in chief JG Hardman & LE Limbird, Eds PB Molinoff & RW Ruudon. USA: McGraw Hill.
- O'Donnell R & Saar N 1974 The effects of 6-hydroxydopamine and guanethidine on peripheral adrenergic nerves in the guinea pig. *European Journal of Pharmacology* **28**: 251–256.
- Orczyck G, Caldwell BV & Behrman 1974 Estrogens: estradiol, estrone and estril. In *Methods of Hormone Radioimmunoassay*, ch 19, pp 333–358. Eds BM Jaffe & HR Behrman. New York, London: Academic Press.
- Peddie MJ 1976 Ovarian follicular development in the immature guinea pig. *Annales de Biologie Animale, Biochimie et Biophysique* **16**: 313–314.
- Pitzel L, Jarry J & 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.
- Potashnik G, Insler V & Meizner J 1987 Frequency, sequence, and side of ovulation in women menstruating normally. *British Medical Journal* **294**: 219.
- Riboni L, Escamilla C & Domínguez R 1995 Advanced puberty in ovariectomized and hemiovariectomized female guinea pigs with ovarian autograft and treated with gonadotropins. *Medical Science Research* **23**: 307–308.
- Richards JS 1979 Hormonal control of ovarian follicular development. *Recent Progress in Hormone Research* **35**: 343–368.
- Rosas P, Arguello MS & Domínguez R 1989 Effects of noradrenergic peripheral denervation on spontaneous or induced puberty in normal and hypothyroid hairless female mice. *Medical Science Research* **17**: 285–286.
- Ross GT 1990 Follicular development: the life cycle of the follicle and puberty. In *Control of the Onset of Puberty*, ch 17, pp 376–386. Eds MM Grumbach, PC Sizonenko & ML Aubert. Baltimore, USA: Williams & Wilkins.
- Weibel ER 1979 *Stereological Methods Vol 1. Practical Methods for Biological Morphometry*. London: Academic Press Inc.

Received 5 October 1995

Final version received 16 July 1997

Accepted 7 August 1997

Another possibility is that guanethidine administration results in an alteration of ovarian sensory nerve fibres. In long-term guanethidine-treated rats, an increase in the number of fibres expressing the neuropeptide calcitonin gene-related peptide (CGRP) has been described (Aberdeen *et al.* 1990, Mione *et al.* 1992). In the periphery, CGRP has been implicated mainly in sensory functions and, in particular, in pain transmission (Mione *et al.* 1992).

To our knowledge, there is no information on the kind of information conveyed by the ovarian sensory nerve fibres. If such fibres exist in the guinea pig ovary, based on the increased mean number and diameter of antral follicles, we could postulate that such innervation sends information about the secretion of substances such as activin affecting FSH secretion by the pituitary. In addition, the 'partial' sympathetic denervation would result in hypersensitivity of the follicles to gonadotrophins.

Age progression of vaginal opening reflects early oestrogen secretion by the ovary. Such a view is supported by the similarity in the serum oestrogen levels observed in guanethidine-denervated animals and in controls, (denervated animals appeared 10 days more advanced than controls). It is generally accepted that the largest healthy follicles produce higher amounts of oestrogen (Greenwald & Roy 1994). Since the number of follicles with a diameter greater than 600  $\mu\text{m}$  in the ovaries of denervated guinea pigs autopsied in the late follicular phase was higher than in control animals (16 vs 7), we suggest that the number of units producing oestrogen was increased, which resulted in the advancement of vaginal opening. An increase in the sensitivity of the denervated vagina to oestrogen cannot, however, be discounted.

The increased serum progesterone level in denervated animals compared with controls cannot be explained by differences in luteal function, because none of the animals, whether denervated or control, had corpora lutea in their ovaries. Studies *in vitro* using ovarian thecal interstitial cells showed that the addition of norepinephrine, epinephrine or isoproterenol to the medium enhanced androgen production in response to human chorionic gonadotrophin (hCG) (Dyer & Erickson 1985). This sympathetic alteration in ovarian innervation induced by guanethidine treatment would result in the accumulation of progesterone, while an active aromatase would convert any androgens which are present to oestrogen, resulting in the normal serum levels observed. Another possibility is that guanethidine administration results in changes in the ovarian content of neuropeptide Y and substance P. There is evidence that both peptides stimulate *in vitro* ovarian progesterone secretion (Pitzel *et al.* 1991). There is controversial evidence of the effects of guanethidine on substance P fibre content. Changes in the number of substance P fibres in guanethidine-treated rats were not observed by Aberdeen *et al.* (1990), while a significant increase of such fibres has been described by Mione *et al.*

(1992). Because the weight of the adrenals was higher in denervated guinea pigs than in controls, we can suppose that the progesterone measured in denervated animals is of adrenal origin.

The advanced ovulation observed in noradrenergic-denervated animals (true puberty), would agree with Ross's (1990) statement that 'the steroid hormones mediate some of the effects of gonadotrophins on preovulatory growth and differentiation, because oestrogen induces the LH receptors (Richards 1979) and aromatase activity in granulosa cells (Daniel & Armstrong 1983)'. The high serum oestrogen level observed in newborn denervated animals killed in the late luteal phase can be explained by the increased number of healthy follicles observed in the ovaries of these animals (812 vs 416). Such an increase was not observed in those animals treated with guanethidine beginning on day 10 of life, and is in agreement with the fact that the number of healthy follicles was similar to control animals (436 vs 416). The low progesterone levels measured in the serum of all denervated guinea pigs killed during the late luteal phase suggest that noradrenergic ovarian innervation plays a stimulatory role in the control of corpora lutea function.

The higher incidence of atresia in larger follicles (diameter >600  $\mu\text{m}$ ) in denervated animals than in controls cannot be explained by endocrine modifications. There is evidence that (1) norepinephrine acts synergistically with LH/hCG on the stimulation of androgen secretion (Dyer & Erickson 1985), (2) in the peripubertal stage of the rat, the number of  $\beta_2$ -adrenergic receptors is very high and their stimulation results in an increase in testosterone output (Aguado *et al.* 1982), (3) ovarian denervation produced a decrease in the  $\Delta^5$ - $3\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activity in the rat ovary during pregnancy (Burden & Lawrence 1977), and (4) in accordance with Greenwald and Roy (1994), the steroid profiles in atretic follicles demonstrate a fall in oestrogen secretion, attributable to a shutdown in thecal androgen secretion. Therefore, the increase in the number of atretic follicles in the ovaries of guanethidine-denervated guinea pigs reflects the modification of other mechanisms regulating the atresia of the follicles related, perhaps, to thecal vascularity (Greenwald 1993).

According to Mills and Reed (1971) there exists a 'crucial period' just before first oestrus for the ovary of guinea pigs to ovulate in response to exogenous gonadotrophins. At this time ovulation can be induced by gonadotrophin administration, while 'immature controls' treated with four daily injections of ovine FSH did not show signs of oestrogen secretion (vaginal opening did not occur) or ovulation 24 h after the last injection. Such an idea was not supported by the studies of Curry *et al.* (1984) and Riboni *et al.* (1995), who have shown that the sequential administration of pregnant mare's serum gonadotrophin (PMSG) followed by hCG to 25- or 10-day-old guinea pigs, resulted in the advancement of

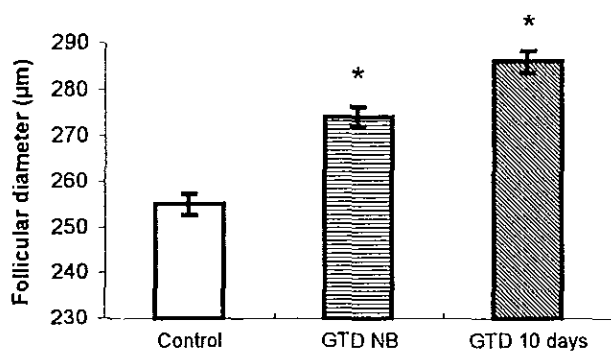


Figure 1 Follicular diameter ( $\mu\text{m}$ ) measured in the ovaries of control and newborn (GTD NB) or 10-day-old (GTD 10 days) denervated guinea pigs. Values are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.05$  compared with control group (ANOVA followed by Tukey's test).

luteal phase, the serum oestrogen concentrations in animals denervated from birth were higher than in controls ( $147.52 \pm 10.5$  vs  $86.79 \pm 9.8$  pg/ml;  $P < 0.05$ , Student's *t*-test), while when the administration of guanethidine began on day 10, significant differences compared with the controls were not observed ( $75.80 \pm 12.3$  vs  $86.93 \pm 9.8$  pg/ml). All denervated animals killed during the late luteal phase had lower serum progesterone levels than in the controls ( $0.59 \pm 0.1$ ;  $0.76 \pm 0.4$  vs  $1.63 \pm 0.4$  ng/ml;  $P < 0.02$ , ANOVA followed by Tukey's test).

The mean number of follicles counted in the ovaries of denervated guinea pigs was significantly higher than in control animals ( $1736 \pm 230$  vs  $969 \pm 147$ ;  $P < 0.05$ , Mann-Whitney U test). The mean diameter of the follicles in the untouched control ovary of animals killed in the late follicular phase was significantly larger than those killed in the late luteal phase ( $263 \pm 3.9$  vs  $248 \pm 3.0$   $\mu\text{m}$ ;  $P < 0.01$ , Student's *t*-test).

The total and relative (percentage) number of follicles with diameters larger than  $600 \mu\text{m}$  measured in the ovaries of guanethidine-treated animals was significantly higher than in controls (late follicular phase,  $3.17\%$  vs  $1.86\%$ ; late luteal phase,  $3.78\%$  vs  $1.65\%$ ;  $P < 0.05$ , Chi square test). In these follicles, the incidence of atresia was also higher in denervated animals (late follicular phase,  $3.12\%$  vs  $1.15\%$ ; late luteal phase,  $3.02\%$  vs  $1.91\%$ ;  $P < 0.05$ , Chi square test).

The mean diameter of the follicles measured in the ovaries of denervated animals was significantly larger than in controls (Fig. 1). When the results were analysed according to the phase of the oestrous cycle when the animals were killed, such differences were significant only in those animals killed in the late luteal phase (Fig. 2).

The follicular diameter in healthy and atretic follicles in those animals killed in the late follicular or the late luteal phase, was affected by sympathetic denervation in a different way. The mean diameter of the healthy follicles of guanethidine-treated guinea pigs, killed in the late

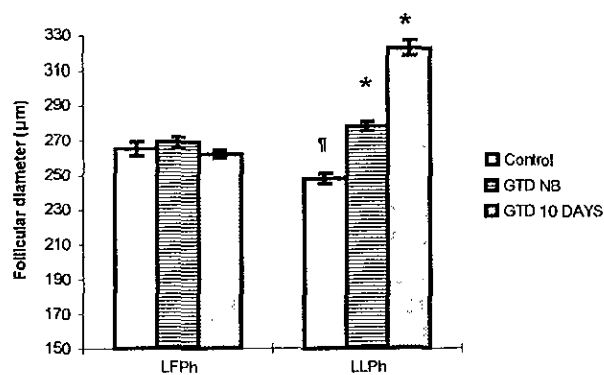


Figure 2 Follicular diameter ( $\mu\text{m}$ ) measured in the ovaries of control and newborn (GTD NB) or 10-day-old (GTD 10 days) denervated guinea pigs killed during the late follicular phase (LFPh) or the late luteal phase (LLPh). Values are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.01$  compared with control group; † $P < 0.01$  compared with LFPh (ANOVA followed by Tukey's test).

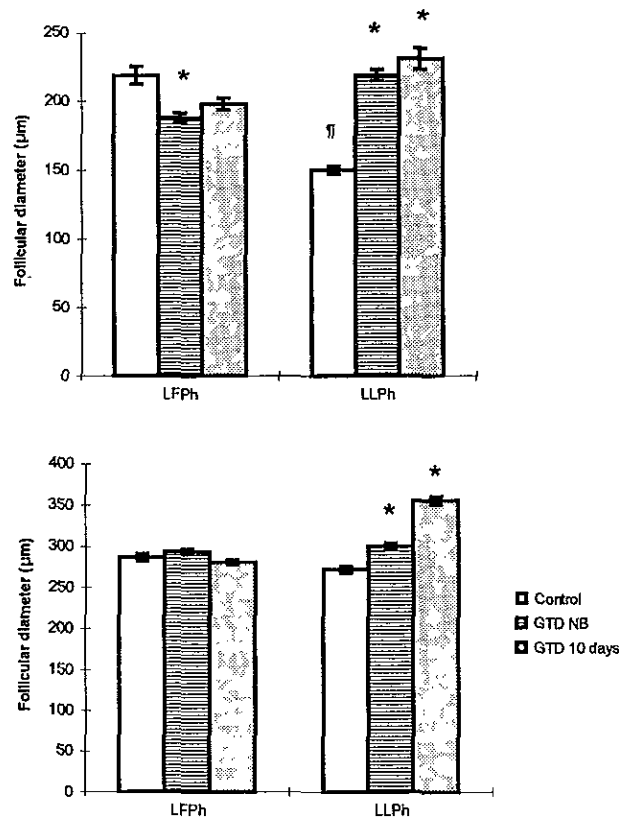


Figure 3 Follicular diameter ( $\mu\text{m}$ ) measured in the ovaries of control, newborn (GTD NB) and 10-day-old (GTD 10 days) guinea pigs treated with guanethidine and killed in the late follicular phase (LFPh) or the late luteal phase (LLPh). Upper panel: healthy follicles; lower panel: atretic follicles. Values are means  $\pm$  S.E.M. \* $P < 0.01$  compared with proper control; † $P < 0.01$  compared with left control ovary (ANOVA followed by Tukey's test).