

51262

2
2j



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
ZARAGOZA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARTICIPACION DE LA INERVACION
CATECOLAMINERGICA, PRESENTE EN LA GONADA
FETAL DE LA RATA, SOBRE EL CRECIMIENTO Y
DIFERENCIACION DEL FOLICULO OVARICO

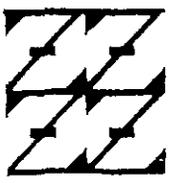


T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS EN BIOLOGIA

(SISTEMAS HUMANOS)
P R E S E N T A
UBALDO QUIROZ LOPEZ

UNAM
FES
ZARAGOZA



LO HUMANO ES
DE NUESTRA RESELECCION

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

MEXICO, D. F.

FEBRERO 1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

27/08/85



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES

* ZARAGOZA *

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

**PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN CATECOLAMINÉRGICA,
PRESENTE EN LA GÓNADA FETAL DE LA RATA, SOBRE EL
CRECIMIENTO Y DIFERENCIACIÓN DEL FOLÍCULO OVÁRICO**

Autor: **Ubaldo Quiróz López**

Directora: Dra. Leticia Morales Ledesma

La tesis fue desarrollada en el Laboratorio de Fisiología Reproductiva, perteneciente a la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción (UIBR). FES-Zaragoza, UNAM.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de DGAPA a través del "*Programa de Becas Nacionales para la Formación y Superación del Personal Académico de la UNAM*", de PADEP y del Programa Universitario de Investigación en Salud (PUIS), UNAM y de CONACyT.

AGRADECIMIENTOS

Al más grande científico de todos los tiempos: *Dios*

A mi esposa: *Paty*

Por su apoyo incondicional y ayuda en la realización de esta tesis, por su comprensión y sobre todo por su amor, sin los cuales no hubiera podido alcanzar esta meta. Porque si tuviera la capacidad de expresar con palabras lo que me hace sentir y lo que representa para mí, podría escribir el poema más bello jamás escrito.

A mis hijos: *Metztli Iréti y Yeix de Jesús*

Por su amor, apoyo y su comprensión por los momentos en que no me encuentro físicamente con ellos y porque representan el amor y la esperanza de sus padres.

A mis padres: **Ma. Salud y Ubaldo**

Por su amor y apoyo en todo momento y por haberme enseñado a no rendirme y superarme en todos los aspectos.

Virginia y Edmundo

Por su invaluable apoyo e interés y sobre todo por hacerme sentir también como un hijo suyo.

A mis hermanos: **Adriana, David, Edmundo, Francisco, Jesús, Luis Antonio, Ma. Guadalupe, Maricruz y Rosa María.**

Porque saben cuanto los quiero y lo orgulloso que estoy de ellos. Porque nunca olvidemos lo fuerte de nuestros lazos.

Con todo cariño y amor a mi sobrinita **Mitzi** y por ser como una hermana para mis hijos.

A todos y cada uno de mis familiares: Tíos, primos, sobrinos, etc.

A la memoria de mis **seres queridos** que han partido y que no pudieron estar físicamente conmigo en estos momentos.

A **mis amigos** por su invaluable amistad y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. **Leticia Morales Ledesma** por su apreciable amistad, por su confianza y apoyo incondicional.

Al Dr. **Roberto Domínguez Casalá** por su valiosa ayuda e interés en todo momento. Porque sus sugerencias han sido fundamentales en el desarrollo de este trabajo.

A los miembros del jurado:

Dra. **Leticia Morales Ledesma**
Dr. **Manuel Salas Alvarado**
Dra. **Margarita Virginia González del Pliego Olivares**
Dra. **Laura Ofelia Riboni Rodríguez**
Dr. **Roberto Domínguez Casalá**

Por sus valiosas sugerencias y el interés mostrado en todo momento en la realización de este estudio.

A la Dra. **Patricia Rosas Saucedo** por su ayuda, por su amistad, por haberme brindado la oportunidad de dar mis primeros pasos en la investigación.

A la Dra. **María Elena Ayala Escobar** por su colaboración en la medición de las catecolaminas hipotalámicas, por su amistad y ayuda incondicional.

A **Ma. Luisa Illescas Vera** por su valiosa ayuda y amistad.

Al Biól. **Roberto Chavira** del Laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", por su colaboración en la realización del RIA y sobre todo por su amistad.

A todos y cada uno de mis **compañeros**: Alejandro D., Alejandro C., Ana Isabel, Ana Lilia, Angélica, Berenice, Bertha, Carolina, Daniel, Francisco, Gerardo, José Luis, Josefina, Juana, Judith, Leticia, Lorena G., Lorena H., Luis, Marco, Ma. Elena, Ma. Esther, Ma. Luisa, Ma. de Jesús, Marta, Paola, Patricia, Rebeca, Roberto, Rocio, Romeo, Rubén, Selene y Sonia, por su amistad y contribución para la realización de esta tesis y porque seamos más unidos.

A la **Carrera de Cirujano Dentista** y en especial a la **C.D. Amparo García González** por su amistad, por su confianza y por haberme dado la oportunidad de iniciarme en la docencia.

A mis compañeros del Laboratorio de Histología. Al **M. en IBSH Gerardo Llamas Velázquez** y al **C.D. Luis Humberto Velázquez Mendoza** por su valioso apoyo, compañerismo y sobre todo por brindarme su amistad.

A **mis alumnos** y porque espero seguir superándome académicamente y darles más de mí.

A todos los **maestros** que he tenido, por su vocación y sus invaluable conocimientos.

A **Carolina M., Lorena H. y Rocío B.**, por su valiosa ayuda, su compañerismo y ante todo su amistad.

Al **personal académico y técnico del Bioterio de la FES Zaragoza** por el cuidado brindado a los animales empleados en la realización de este trabajo.

A las **"ratas"** por ser unos animalitos muy dóciles y nobles.

La escritura estudiosa
que llevas adentro,
el travieso ser espiritual
que encarna tu auténtica personalidad,
te guía por la vida.

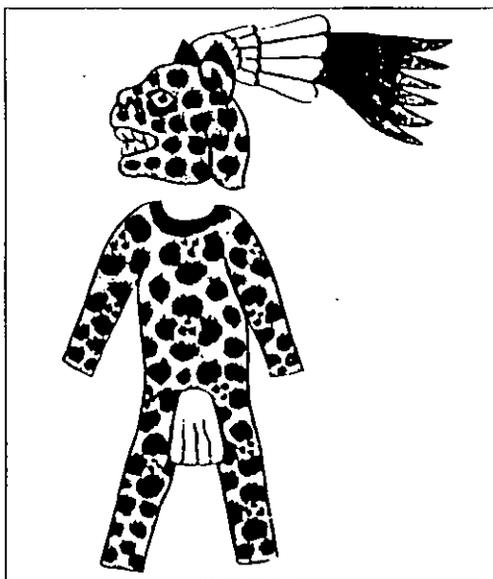
Nunca
te conceden un deseo
sin concederte también la facultad
de convertirlo en realidad.

No vuelvas la espalda
a los futuros posibles
antes de estar seguro de que no tienes
nada que aprender de ellos.

Sin embargo,
es posible que te cueste
trabajo.

Siempre gozarás de libertad
para cambiar de idea
y elegir otro futuro,
u otro
pasado.

(Richard Bach).



OCELOTL. Traje de "guerrero ocelote o tigre", este bello atuendo era portado por aquellos guerreros mexicas que lograban capturar a cuatro enemigos en la guerra. Hoy día, el ocelote es orgullosamente la mascota de la FES Zaragoza, UNAM. Sin embargo, este animal desgraciadamente está en vías de extinción como muchas especies de nuestra fauna y flora.

Í N D I C E

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	1
<i>Pubertad</i>	1
<i>Catecolaminas</i>	5
<i>Inervación del tracto reproductivo</i>	7
• <i>Inervación del ovario</i>	7
• <i>Inervación del oviducto</i>	8
• <i>Inervación del útero</i>	10
• <i>Inervación de la vagina</i>	10
<i>Inervación simpática de otros órganos periféricos</i>	11
<i>Crecimiento folicular</i>	12
<i>Esteroidogénesis</i>	17
<i>Modelos de estudio</i>	20
• <i>Guanetidina (efectos y mecanismo de acción)</i>	20
• <i>6-hidroxidopamina (efectos y mecanismo de acción)</i>	22
<i>Participación de la inervación simpática en eventos reproductivos</i>	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	27
HIPÓTESIS	27
OBJETIVOS	28
MATERIAL Y MÉTODOS	29

RESULTADOS	34
<i>Efectos de la denervación catecolaminérgica sobre la preñez</i>	34
<i>Efectos de la denervación catecolaminérgica sobre la pubertad y la primera ovulación</i>	35
<i>Concentraciones de catecolaminas hipotalámicas</i>	44
<i>Concentraciones séricas de estradiol, progesterona y testosterona</i>	51
<i>Crecimiento y diferenciación folicular</i>	54
<i>Concentraciones de catecolaminas ováricas</i>	61
<i>Concentraciones de catecolaminas de la médula suprarrenal</i>	65
DISCUSIÓN	69
CONCLUSIONES	86
PERSPECTIVAS	87
BIBLIOGRAFÍA	88

RESUMEN

Existen evidencias en la literatura que muestran la participación de la inervación catecolaminérgica en regulación de las funciones del ovario, como son la esteroidogénesis y el crecimiento folicular, la cual varía a lo largo de la vida del individuo. En la rata, esta inervación aparece desde la etapa fetal y poco se sabe acerca de su participación en los mecanismos de regulación de la gónada fetal y durante las etapas tempranas del desarrollo posnatal. Por lo cual, en este trabajo se decidió analizar en la rata el efecto de la eliminación farmacológica de estas fibras desde el día 13 de vida fetal sobre el crecimiento y diferenciación folicular.

Se utilizaron ratas preñadas de la cepa CII-ZV a las que se les inyectó a los 13, 15, 17 y 20 días, 20 mg/kg i.p. de guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y en el caso de los animales testigo se les inyectó un volumen equivalente de solución salina (NaCl al 0.9 %). Se evaluó la duración de la preñez y el número de crías nacidas vivas o muertas. Las crías se sacrificaron por decapitación al nacimiento, a los 10, 20, 30 días de edad o al primer estro vaginal.

La denervación realizada con GTD o 6-OHDA no modificó significativamente la duración de la preñez, ni el número de crías nacidas vivas o muertas.

En los animales tratados con GTD y sacrificados al nacimiento disminuyó la concentración de noradrenalina del bazo por debajo de la sensibilidad del método. En los tratados con 6-OHDA se depletó en el timo y en el hipotálamo la dopamina. Se observó un efecto diferencial de los fármacos, mientras que la GTD afectó al sistema noradrenérgico, la 6-OHDA dañó al dopaminérgico.

En comparación con el grupo inyectado con solución salina, no se modificó el peso corporal de los grupos con denervación periférica inducida con GTD. En tanto que en los tratados con 6-OHDA se observó incremento significativo en los sacrificados al nacimiento (7.0 ± 0.2 vs. 5.0 ± 0.2 , $p < 0.05$), a los 10 días (19.5 ± 0.4 vs. 15.5 ± 1.4 , $p < 0.05$), y al primer estro vaginal (115.0 ± 2.3 vs. 104.5 ± 2.9 , $p < 0.05$).

En los animales con simpatectomía provocada por la administración de GTD se retrasó la edad de apertura vaginal (48.1 ± 1.1 vs. 44.0 ± 1.3 , $p < 0.05$) acompañada de una disminución en la concentración sérica de P_4 tanto a los 30 días (1.7 ± 0.1 vs. 2.4 ± 0.2 , $P < 0.05$) como al primer estro vaginal (1.5 ± 0.2 vs. 3.4 ± 0.4 , $p < 0.05$); la concentración sérica de estradiol no se modificó en ninguna de las edades evaluadas y la de testosterona disminuyó a los 10 días (0.019 ± 0.002 vs. 0.156 ± 0.057 , $p < 0.05$) y a los 20 días de edad (0.024 ± 0.009 vs. 0.25 ± 0.07 , $p < 0.05$). En los animales tratados con 6-OHDA no se retrasó la edad de apertura vaginal, la concentración sérica de estradiol presentó un incremento a los 10 días de edad (43.2 ± 4.9 vs. 8.4 ± 1.5 , $p < 0.05$), mientras que la concentración de testosterona

disminuyó a los 20 días (0.033 ± 0.018 vs 0.25 ± 0.07 , $p < 0.05$) y a los 10 días la concentración estuvo por debajo de la sensibilidad del método.

La concentración de noradrenalina ovárica en los animales denervados sólo se modificó en el ovario izquierdo. Al nacimiento se presentó un incremento en los animales tratados con GTD (0.72 ± 0.09 vs 0.34 ± 0.07 , $p < 0.05$) o al primer estro en el grupo con 6-OHDA (0.93 ± 0.04 vs 0.77 ± 0.02 , $p < 0.05$). En los animales denervados con 6-OHDA se presentó una depleción de la concentración de la dopamina en ambos ovarios a los 30 días. Y en los tratados con GTD se observó un incremento en el ovario izquierdo al primer estro vaginal (0.09 ± 0.01 vs 0.03 ± 0.01 , $p < 0.05$).

El número de folículos totales fue mayor a los 10 días de edad en los animales tratados con GTD (613.0 ± 50.8 vs 386.0 ± 72.9 , $p < 0.05$). Este incremento correspondió a los folículos atrésicos menores de $70 \mu\text{m}$ de diámetro (174.3 ± 40.6 vs 41.3 ± 15.7 , $p < 0.05$). En los animales tratados con 6-OHDA se presentó a los 10 días una disminución en el número de folículos sanos (137.0 ± 34.8 vs 257.7 ± 30.3 , $p < 0.05$) como consecuencia de una disminución en el número de folículos menores de $70 \mu\text{m}$ (28.0 ± 11.0 vs 150.7 ± 46.5 , $p < 0.05$) y un incremento al primer estro vaginal en el número de folículos sanos (187.0 ± 3.1 vs 126.7 ± 5.5 , $p < 0.05$).

En los animales recién nacidos la concentración de catecolaminas en la médula suprarrenal se incrementó tanto en los animales tratados con GTD como con 6-OHDA, el incremento de dopamina llegó a ser más del doble del contenido registrado en el grupo con vehículo. En cuanto a la noradrenalina el incremento fue del triple en ambos grupos con denervación. Finalmente, en el caso de la adrenalina el incremento en los animales con administración de GTD o 6-OHDA fue de más del doble con respecto al grupo testigo.

Estos resultados nos permiten plantear que la inervación noradrenérgica, presente desde la etapa fetal, estimula los mecanismos neuroendócrinos que conllevan al inicio de la pubertad. Es probable que esta inervación module de manera estimuladora el crecimiento y diferenciación de los folículos pequeños, al estimular la aparición de receptores a gonadotropinas.

INTRODUCCIÓN

Pubertad

En la actualidad no se cuenta con una definición de la pubertad que sea aceptada por todos los expertos del área. Sin embargo, se sabe que este proceso involucra el crecimiento y la maduración de los órganos genitales y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios lo cual le permite al individuo adquirir la capacidad de reproducirse sexualmente. En el humano y en los primates superiores la primera menstruación es la señal que determina que la hembra ha alcanzado la pubertad (Plant, 1994).

Ojeda y col., (1980 a,b) plantean que en la rata hembra la señal que indica el inicio de su función reproductora es la canalización de la vagina y la primera ovulación, que suele producirse un día después del incremento brusco y caída de las gonadotropinas, referido como "pico preovulatorio" (Figura 1). Con base a parámetros morfo-fisiológicos relacionados con el eje hipotálamo-hipófisis-gónada se ha dividido el desarrollo de la rata hembra en cuatro etapas, desde el nacimiento hasta el inicio de la pubertad (Ojeda y col. 1980 a,b). Sin embargo, existen una serie de evidencias experimentales que hacen pensar que desde la etapa fetal, se producen una serie de eventos que son determinantes en el inicio de la pubertad.

Etapa Fetal: En esta etapa se presentan algunos eventos anatomo-fisiológicos encaminados a la maduración del eje hipotálamo-hipófisis-gónada. En el día 12 de gestación se ha podido detectar en el cerebro por métodos inmunoreactivos la localización de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH). Las concentraciones hipotalámicas de éste péptido permanecen bajas hasta alrededor de los días 17 y 18, momento en el cual comienzan a incrementarse hasta el nacimiento. En el hipotálamo medio basal y en el área preóptica empieza a incrementarse la actividad de la aromatasa P-450 (enzima que aromatiza los

andrógenos a estrógenos) a partir del día 16, alcanza un máximo a los 19 días para disminuir después del nacimiento a concentraciones muy bajas pero detectables, (Lephart y col., 1992). Por otra parte, por técnicas de histofluorescencia en el hipotálamo se ha mostrado la aparición de fibras catecolaminérgicas a partir del día 15 de desarrollo fetal. Un día después comienza a tener la capacidad de síntesis, liberación y recaptura de catecolaminas (Borisova y col., 1991). En la hipófisis es posible detectar a la hormona luteinizante (LH) desde el día 17, mientras que la hormona estimulante del folículo (FSH) a partir de los días 19 al 21. En el ovario se ha podido detectar, por método de inmunohistoquímica, la presencia de fibras catecolaminérgicas a partir de los 19 días del desarrollo fetal (Malamed y col., 1992).

Etapa Neonatal: abarca desde el nacimiento hasta el día 7 de vida. En esta etapa el eje hipotálamo-hipófisis-ovario aún es inmaduro. En los primeros cinco días de vida el ovario de la rata no responde a la administración con gonadotropinas. Existen evidencias de que el crecimiento folicular se inicia de manera independiente de estas hormonas, dado que en los primeros cuatro días de vida no se han formado los receptores a éstas, aunque existen los folículos preantrales (Peter, 1970). Aún no es funcional el mecanismo de retroalimentación inhibitorio ejercido por los estrógenos sobre el hipotálamo y la hipófisis, debido a que la mayor parte de estas hormonas se encuentran unidas a la alfa-fetoproteína (proteína que tiene una alta afinidad a los estrógenos) por lo que en los primeros días de vida, las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas permanecen elevadas (Ojeda y col., 1986).

Etapa Infantil: inicia en el día 8 y termina a los 21 días de vida. Se caracteriza por concentraciones plasmáticas muy altas de la FSH, mientras que la liberación de la LH es en forma de "picos esporádicos" (Döhler y Wuttke, 1974; Mackinnon y col., 1976; Wuttke y col., 1980). Las concentraciones altas de FSH son fundamentales para el reclutamiento y crecimiento de los folículos que llegarán a ovular en la pubertad (Hage y col., 1978; Ojeda y col., 1980a). A partir del día 15 de vida

disminuye la concentración de FSH plasmática y desaparecen los "picos" de LH (Rivier y Vale, 1987; Sander y col., 1987). La concentración de estrógenos libres aumenta a partir del día 16 de vida, como respuesta a la disminución en la concentración plasmática de la alfa-fetoproteína. En esta etapa el útero es capaz de responder a la estimulación con estrógenos (Ojeda y col., 1986).

Etapa Juvenil: abarca del día 21 al 30 de vida. En esta etapa continúa disminuyendo la concentración plasmática de FSH. Al inicio de esta etapa las concentraciones de LH son bajas y constantes, posteriormente, comienza a secretarse en forma pulsátil y a incrementar sus concentraciones y la amplitud de sus pulsos. Se establece así un ritmo de secreción circádico (Andrews y Ojeda, 1981; Meijs- Roelofs y col., 1983; Urbanski y Ojeda, 1983). Se ha descrito que en el ovario se presentan ondas de crecimiento y atresia folicular. En esta etapa del desarrollo en el ovario de la rata, no se observan folículos preovulatorios. Es al final de esta etapa e inicio de la peripuberal, en donde se puede observar en la luz del útero la acumulación de líquido como una de las señales de la actividad estrogénica (Ojeda y col., 1986).

Etapa Peripuberal: su duración es variable y culmina con la primera ovulación. En el ovario se incrementa el número de receptores a la FSH y LH lo que se traduce en una máxima respuesta esteroideogénica (Urbanski y Ojeda 1987; Ojeda y Urbanski, 1994). En consecuencia se incrementan las concentraciones plasmáticas de testosterona, progesterona y estradiol; ésta última estimula la canalización vaginal. Las altas concentraciones de esteroides plasmáticos estimulan al hipotálamo para la secreción sincronizada de la GnRH que culmina con la liberación preovulatoria de las gonadotropinas y la primera ovulación.

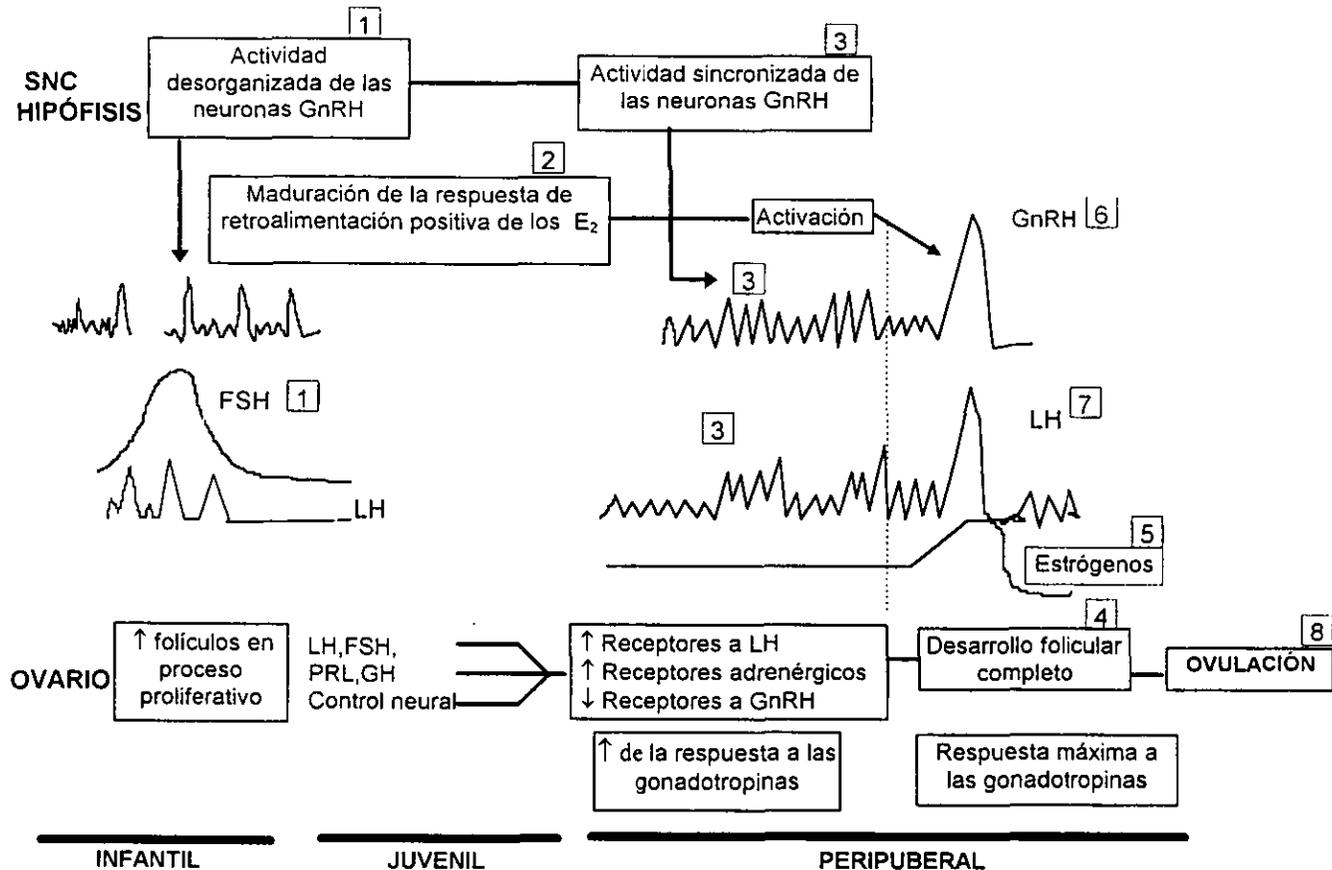


Figura 1. Secuencia de eventos que se suceden en el Sistema Nervioso Central (SNC), la hipófisis y el ovario previos al pico preovulatorio de las gonadotropinas en la rata hembra. Los números indican la secuencia en la cual se producen estos eventos. La línea discontinua representa las 12:00 h del primer proestro. GnRH: hormona liberadora de las gonadotropinas, LH: hormona luteinizante, FSH: hormona estimulante del folículo, PRL: prolactina, GH: hormona de crecimiento (Tomado de Ojeda y Urbanski, 1994).

Catecolaminas

Las catecolaminas son moléculas que actúan como neurotransmisores y hormonas, que son sintetizadas por el sistema nervioso central y periférico y por las células cromafines de las suprarrenales (Weiner y Molinoff, 1994). En el ovario las catecolaminas estimulan la esteroidogénesis, por la activación de receptores β -adrenérgicos. En el folículo ovárico favorecen la contracción de las células musculares, por activación de receptores α -adrenérgicos (Kannisto y col., 1985). Estos resultados permiten sugerir que las catecolaminas estimulan la ovulación. En el aparato reproductor las catecolaminas modulan el flujo sanguíneo. (Marshall, 1973).

Las catecolaminas son sintetizadas a partir de su aminoácido precursor, la tirosina, mediante una secuencia de reacciones enzimáticas. La tirosina se encuentra normalmente en la circulación sanguínea y la biosíntesis se inicia con la adición de un grupo hidroxilo en la posición meta del aminoácido, por la acción de la tirosina hidroxilasa (TH) para formar así la 3,4-dihidroxi-L-fenilalanina (L-DOPA, ver Figura. 2). Esta es convertida a dopamina (DA) por la DOPA descarboxilasa. En las neuronas dopaminérgicas es la parte final de la vía biosintética, mientras que en las neuronas noradrenérgicas esta DA es usada como sustrato para que la dopamina- β -hidroxilasa (DBH) la convierta a noradrenalina (NA). En algunos grupos de neuronas del sistema nervioso central y las células de la médula suprarrenal en las cuales la adrenalina (A) es la neurohormona primaria, la feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) cataliza la conversión de noradrenalina a adrenalina (Weiner y Molinoff, 1994).

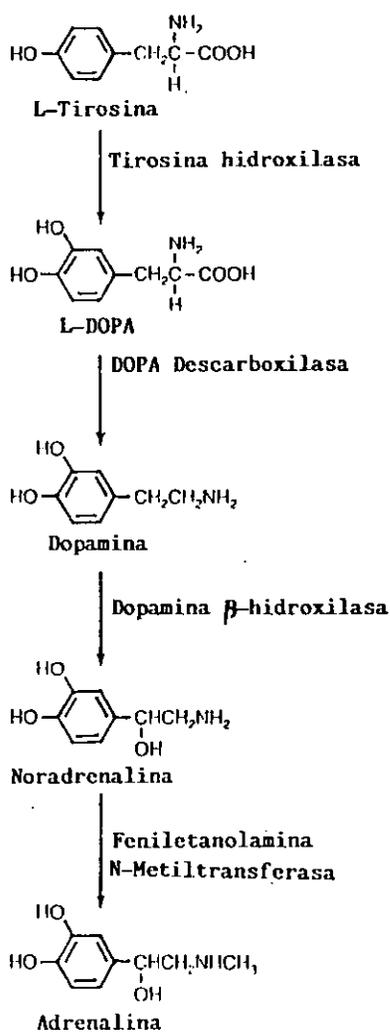


Figura 2. Biosíntesis de las catecolaminas. A un lado de las flechas se indica el nombre de las enzimas que intervienen en la síntesis. Tomado de Weiner y Molinoff, 1994.

Inervación del tracto reproductivo

En los mamíferos la inervación simpática llega al ovario por dos rutas independientes: el plexo ovárico a lo largo de la arteria ovárica y el nervio ovárico superior por el ligamento suspensorio (Figura 3; Lawrence Jr. y Burden, 1980). Los somas de las fibras simpáticas preganglionares se localizan en los segmentos T-10 y T11 de la médula espinal, mientras que los de las fibras postganglionares se originan del plexo celiaco o renal. Estas fibras se consideran como neuronas simpáticas "largas" ya que sus somas no se encuentran cerca del órgano efector (Burden, 1985). En el ovario de la rata esta inervación aparece a los 16 días de vida fetal (Ojeda y col., 1986). Adicional a las fibras simpáticas, fibras sensoriales acompañan a aquellas y penetran el cordón espinal al nivel T-10. La inervación parasimpática del ovario es aportada por el nervio vago, cuyos somas se encuentran a nivel T-10 y T11 de la médula espinal (Burden, 1978).

Se ha encontrado inervación de tipo peptidérgica que llega al ovario vía plexo ovárico, tal es el caso del neuropéptido Y (NPY), de la sustancia P (SP) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), mientras que, las fibras del péptido intestinal vasoactivo (VIP) son transportadas por el nervio ovárico superior (Ahmed y col., 1986; Calka y col., 1988; Dees y col., 1986; McDonald y col., 1987).

Se ha mostrado por inmunohistofluorescencia que los nervios catecolaminérgicos se encuentran en relación estrecha con las células epiteliales de los folículos primordiales, en la glándula intersticial y en la teca folicular, sin tener contacto con las células de la granulosa ni las del cuerpo lúteo (Burden, 1985; Papka y col., 1985). Las fibras VIPérgicas se encuentran ocasionalmente asociadas a pequeñas arterias y a folículos primordiales, son más frecuentes en la teca de folículos antrales, en la glándula intersticial y en contacto con la túnica adventicia de las venas (Ahmed y col., 1986). La mayoría de las fibras nerviosas que transportan a

la sustancia P, se localizan en asociación con arterias y arteriolas ováricas y algunas con la teca de los folículos en crecimiento (Dees y col., 1986; Papka y col., 1985). Las fibras del neuropéptido Y se localizan alrededor de los vasos sanguíneos, en la glándula intersticial y entre los folículos (McDonald y col., 1987; Papka y col., 1985). También se ha reportado la presencia de fibras positivas a acetil-colinesterasa (AChE) las cuales se encuentran principalmente en el estroma y asociadas a vasos sanguíneos (Papka y col., 1985).

Inervación del oviducto

El oviducto recibe inervación simpática y parasimpática; la inervación simpática proviene de los nervios hipogástricos y ganglios mesentéricos (superiores e inferiores) y la inervación parasimpática por los nervios pélvicos y sacrales (Patón y col., 1978). Las fibras simpáticas que inervan a los oviductos, el útero y la vagina son consideradas como neuronas simpáticas "cortas" ya que sus somas se localizan cerca del órgano efector (Burden, 1985).

En el oviducto las fibras positivas a AChE forman un plexo, dispuestas de forma longitudinal y circular, se ramifican hacia los fascículos musculares y las arterias. En la muscularis se encuentran fibras noradrenérgicas y NPYérgicas en asociación a arterias oviductales. Algunos nervios VIPérgicos se encuentran en la pared oviductal, mientras que las fibras inmunoreactivas a SP forman un plexo más prominente cuyas fibras están dispuestas principalmente alrededor del oviducto (Papka y col., 1985).

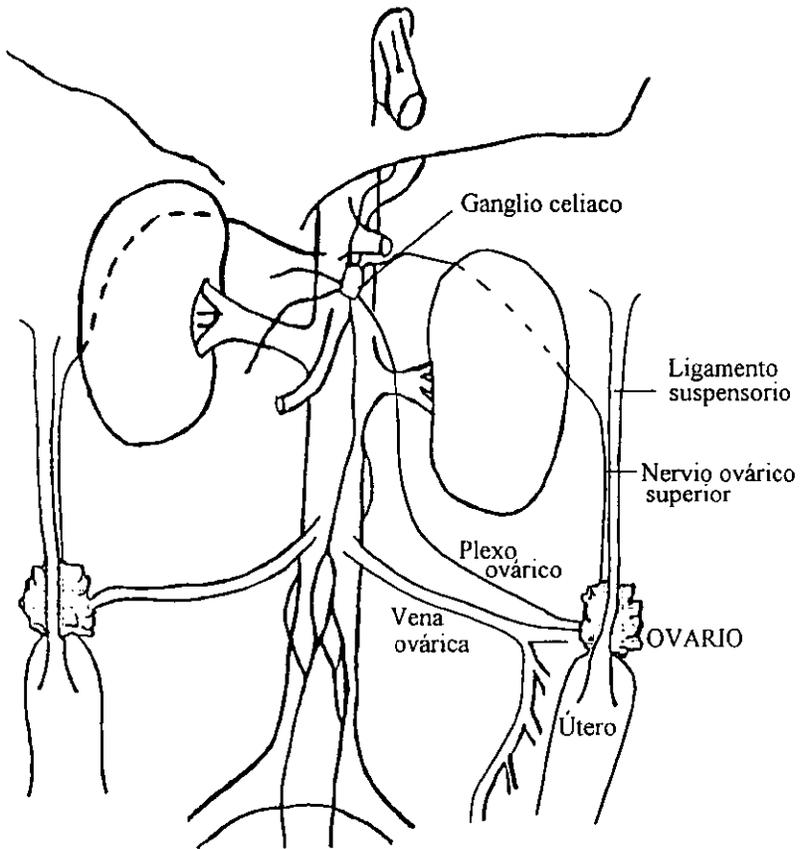


Figura 3. Trayecto del nervio ovárico superior y del plexo ovárico en la rata. Modificado de Klein y col., 1989.

Inervación del útero

La inervación extrínseca del útero deriva de los nervios ováricos, del ganglio cervical uterino y de las ramas simpáticas lumbares (Baljet y Drukker, 1980). Se han observado fibras positivas a AChE en el músculo liso del mesometrio asociadas con los vasos sanguíneos o como ramas nerviosas individuales. En el miometrio, los axones están dispuestos de forma paralela a las fibras musculares, tanto circulares como longitudinales. En el endometrio se localizan asociadas a los vasos sanguíneos (Papka y col., 1985).

Las fibras noradrenérgicas entran al órgano y viajan libremente en el mesometrio o acompañan a las arterias mesometriales. En el mesometrio las ramas finas de estas fibras, provenientes de los troncos paravasculares, forman un ángulo recto y viajan paralelas a los fascículos musculares lisos y a las arterias. En los cuernos uterinos las fibras inmunoreactivas a NPY, VIP y SP forman plexos moderadamente densos. La distribución de estas fibras dentro de las tres capas del útero son muy similares a las colinérgicas y noradrenérgicas (Papka y col., 1985).

Inervación de la vagina

Los nervios de la vagina derivan del ganglio cervical uterino, del plexo nervioso ganglionar del mesometrio y del nervio pudendo (Baljet y Drukker, 1980). En la vagina las fibras se organizan formando troncos grandes que penetran en la pared del órgano y se ramifican formando troncos más pequeños, algunas de las fibras viajan de manera paralela y circunferencial a lo largo del eje del órgano, otras se proyectan en la muscularis y en la mucosa, mientras que otras forman plexos paravasculares o perivasculares (Papka y col., 1985).

La inervación noradrenérgica es moderadamente densa y se encuentra orientada de forma paralela a lo largo del eje del órgano. Se localiza de manera paravascular o perivascular, aunque también hay redes de fibras individuales que se localizan en la muscularis. Se han descrito nervios inmunoreactivos a NPY, VIP y SP, cada uno de estos nervios forman plexos relativamente densos y presentan una orientación y localización muy semejante al de las fibras colinérgicas y noradrenérgicas (Papka y col., 1985).

Inervación simpática de otros órganos periféricos

Existen otros órganos que también reciben inervación simpática, entre los cuales se encuentran el bazo y el timo, dos órganos pertenecientes al sistema inmunológico. El bazo y el timo son inervados por fibras postganglionares de la cadena simpática, como del ganglio colateral. En el caso del bazo el aporte proviene del ganglio celíaco-mesentérico superior, mientras que para el timo es del ganglio cervical superior. Los cuerpos celulares preganglionares se encuentran en la columna de células intermediolaterales de la médula espinal, por ejemplo para el bazo se ubican al nivel T6-T12 (Felten y col., 1988).

En el bazo las fibras penetran al órgano formando el nervio esplénico el cual sigue el trayecto del sistema vascular (Felten y col., 1988). En la rata recién nacida estas fibras se localizan asociadas a la arteria y vena centrales. En los días subsecuentes esta inervación alcanza toda la zona vascular y perivascular, extendiéndose también por el parénquima de la vaina linfática periarteriolar y a lo largo del seno marginal, más tarde alcanzan a inervar la cápsula (Ackerman y col., 1987; Bellinger y col., 1987; Felten y col., 1987).

Las fibras que penetran al timo forman un plexo nervioso; algunas fibras se continúan con la vasculatura dentro de la corteza del tejido, mientras que otras forman un plexo capsular y subcapsular. La inervación del timo está confinada casi exclusivamente a la corteza con muy pocas o ausencia de fibras en la médula (Felten y col., 1988). En el timo mediante estudios de histofluorescencia desde el día 18 de gestación, se han demostrado la presencia de fibras catecolaminérgicas adyacentes a los timocitos (en la porción más superficial de la corteza), y a células epiteliales (en la porción más profunda de la corteza y en la médula). La densidad de esta inervación se incrementa durante el desarrollo posnatal (Leposavic y col., 1992).

Crecimiento folicular

En los mamíferos durante el desarrollo embrionario de la gónada femenina se forma un número determinado de células germinales. En el ovario estas células antes de iniciar la meiosis son conocidas como ovogonias, las cuales aumentan en número por actividad mitótica para formar un número determinado de ovocitos. Este incremento está limitado durante la etapa fetal y poco después del nacimiento. Después la ovogonia se diferencia en ovocito e inicia la meiosis, este proceso se detiene en la profase de la primera división meiótica; en este estado los ovocitos se denominan como ovocitos primarios. En la mayoría de los mamíferos la meiosis se reinicia hasta la pubertad. Una vez que los ovocitos han entrado en la meiosis, se inicia la formación de los folículos ováricos, es decir la foliculogénesis. Este proceso se inicia en la región medular del ovario, los ovocitos que se encuentran agrupados en el interior de los cordones sexuales, empiezan a ser separados por las células epiteliales formando así los primeros folículos. Los ovocitos situados en la región cortical también son separados por células epiteliales y forman folículos que servirán como reserva (Merchant, 1991; Van Voorhis, 1998).

En el humano la foliculogénesis se inicia durante la etapa fetal, entre el 5^o y 6^o mes de gestación (Merchant, 1991), mientras que en los roedores y conejos se inicia en el periodo posnatal (Fortune, 1994). Por ejemplo, en la rata a las 24 hrs. de vida prácticamente no hay folículos, pero a las 36 hrs. se observan más de 500 folículos y este número casi se triplica a las 48 hrs. de vida posnatal (Malamed y col., 1992).

El inicio del desarrollo folicular esta marcado por la transformación de las células de la granulosa planas a cuboidales. El folículo con una sola capa de células de la granulosa cuboidales es denominado como folículo primario. Posteriormente continúa el crecimiento del ovocito y la mitosis de las células de la granulosa para formar dos o tres capas, por otra parte el estroma ovárico se organiza dentro de las capas de la teca, en este estado de desarrollo se denomina folículo preantral. En los folículos antrales el ovocito ha alcanzado su completo crecimiento, presenta varias capas de células de la granulosa, un antro lleno de fluido y capas tecaes bien diferenciadas. El folículo preovulatorio o de Graaf es el que ha alcanzado su diámetro máximo y responde al "pico" preovulatorio de gonadotropinas (Hsueh y col., 1994). Estos folículos crecen por grupos y de manera gradual hasta culminar con la ovulación o con su degeneración (atresia).

La atresia es el proceso mediante el cual los folículos son eliminados antes de alcanzar la ovulación, este fenómeno se puede presentar en cualquiera de las etapas de desarrollo del folículo. El mecanismo molecular que conduce a la degeneración del folículo, es la apoptosis o "muerte celular programada". Se han descrito una serie de características físicas y bioquímicas que indican que un folículo ha entrado a la atresia. Con base en parámetros morfológicos los folículos antrales atrésicos se han dividido en tres estados (Hsueh y col., 1994; Tilly, 1996):

Estado I.- Menos del 10 % de las células de la granulosa presentan núcleo picnótico, algunas más ya no entran en mitosis, hecho que se ve apoyado experimentalmente

por una reducción en la incorporación de timidina tritiada (H^3) de las células de la granulosa.

Estado II.- Se incrementa el número de células de la granulosa que presentan núcleo picnótico (10% al 30%), pocas de ellas entran en mitosis y algunas se localizan en el antro folicular (descamación celular). La membrana basal pierde su integridad es posible ver la presencia de leucocitos en el estrato granuloso. Si el estado de atresia es muy avanzado el folículo no puede recuperar su viabilidad, ni aún con la administración de la gonadotropina del suero de yegua preñada (PMSG).

Estado III.- La reducción de células de la granulosa es mayor, pierden la capacidad de entrar en mitosis y el folículo se colapsa. La capa de la teca se hipertrofia y las células presentan en su citoplasma gotitas de lípidos. El ovocito puede experimentar rompimiento de la membrana germinal. En la oveja y en la rata los ovocitos de folículos atrésicos no pierden la capacidad de ser fertilizados y continuar con el desarrollo embrionario.

Además de los cambios morfológicos que se presentan en los folículos atrésicos, se han determinado una serie de modificaciones bioquímicas:

- En las células de la granulosa disminuye la síntesis de ADN y posteriormente se fragmenta, como resultado de la activación de las endonucleasas.
- Disminución tanto en el número de receptores a gonadotropinas como de la respuesta del folículo a su estímulo.
- Modificación de la respuesta esteroideogénica: disminuye la síntesis de estrógenos y aumenta la producción de progesterona como resultado de la disminución de la actividad de la aromatasa y de la $C_{17,20}$ -liasa.
- Aumento de la concentración de andrógenos en el antro folicular.
- Incremento en la síntesis de proteínas que se unen al factor de crecimiento semejante a la insulina (IGFBPs).

A la fecha no han sido esclarecidos completamente los mecanismos involucrados en la regulación de la foliculogénesis, del crecimiento y la selección de los folículos que llegarán a ovular. Hirshfield y Midgley Jr. (1978) sugieren que el "pico" de FSH es una de las señales hormonales que participan en la selección de los folículos que estarían destinados a ovular en el ciclo subsecuente. Se ha postulado que además de las gonadotropinas existe una serie de factores neurotróficos que modulan estos procesos (Dissen y col., 1991 y 1992; Malamed y col., 1992; Ojeda y col., 1992).

El factor de crecimiento neural (NGF), la neurotensina 3 (NT-3), la neurotensina 4-5 (NT- 4 / 5), la neurotensina 6 (N6) y el factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF) son factores neurotróficos pertenecientes a una familia de neurotrofinas. Los tres primeros factores, así como sus receptores, se han localizado en el ovario. Las acciones biológicas de las neurotrofinas son mediadas por receptores que se encuentran acoplados a la tirosina cinasa y que son codificados por miembros de la familia del protooncogene *trk* (Dissen y col., 1991, 1995 y 1996).

En el ovario de la rata el receptor de baja afinidad para el NGF, el p75 NGFr se ha localizado principalmente en la teca de los folículos en diferentes estados de desarrollo. Al nacimiento se observa un incremento en el RNAm que codifica para la síntesis del receptor p75 NGFr y permanece elevado durante la foliculogénesis (Dissen y col., 1995). Recientemente se reportó que en el ovario de primates adultos se localiza una subpoblación de células semejantes a neuronas, las cuales presentan inmunoreactividad a la TH (enzima limitante en la síntesis de catecolaminas) y al receptor p 75 NGFr (Dees y col., 1995). Dissen y col., en resultados no publicados (citado en Dissen y col., 1991) señalan que el contenido de receptores a NGF esta correlacionado con el grado de atresia folicular, donde el folículo más atrésico presenta un menor contenido de receptor al factor de crecimiento neurotrófico.

Aunado al control que ejercen las neurotrofinas sobre el crecimiento folicular, también participan en este proceso péptidos y factores de crecimiento. Uno de los péptidos involucrados en las funciones del ovario es el VIP. El cultivo de células ováricas provenientes de ratas de 30 días, tratadas un día antes con 2 ui de PMSG incrementa la secreción de estrógenos en la fase del proestro, en presencia del VIP (Ahmed y col., 1986). En ovarios fetales de rata este péptido incrementa la formación de AMPc y la actividad de la aromatasas (George y Ojeda, 1987). Johnson y col., (1994), mostraron que las células de la granulosa de gallina en cultivo con VIP sólo o en presencia de la FSH incrementa la actividad de las enzimas P450 scc y la P 450 17 α -hidroxilasa, que se traduce en un aumento de la actividad esteroideogénica. La adición al medio de cultivo del factor de crecimiento transformador alfa (TGF- α) bloquea la expresión de estas enzimas.

Estudios *in vitro* utilizando folículos antrales de gallina o de rata, mostraron que la adición de VIP al medio disminuye la atresia folicular. Cuando el cultivo se realizó sólo en presencia del factor de crecimiento semejante al insulínico (IGF-I) se inhibió parcialmente la apoptosis. Estos datos llevaron a plantear a los autores que el VIP es un factor de supervivencia celular para los folículos en desarrollo y que sus efectos, en menor proporción se producen a través del incremento intrafolicular del IGF-I o una mayor bioactividad de este (Flaws y col., 1995). Previamente se había mostrado que el IGF-I es sintetizado por las células de la granulosa y que tiene un efecto antiatrésico en folículos preovulatorios, *in vitro* (Chun y col., 1994; Skinner y Parrott, 1994).

También se ha reportado la participación del IGF-I factor en la regulación de la esteroideogénesis ovárica, ya que estimula la actividad de la P 450 scc y la inducción del receptor a LH en las células de la granulosa (Skinner y Parrott, 1994). Mientras que en las células de la teca estimula la expresión RNAm de la 3 β -HSD (hidroxiesteroide deshidrogenasa) y la P 450 scc, en presencia de LH (Magoffin y Weitsman, 1993).

Esteroidogénesis

En la hembra la síntesis de hormonas esteroides se produce en los ovarios, la corteza suprarrenal y la placenta. En el presente trabajo se hará referencia principalmente a la esteroidogénesis del ovario. En este órgano los tipos celulares que intervienen son las células de la teca y las intersticiales del estroma las cuales presentan receptores a la LH y las células de la granulosa que responden primero a la FSH y más tarde a la LH. La biosíntesis de hormonas esteroides no sólo es regulada por las gonadotropinas sino también por los neurotransmisores que son aportados por la inervación extrínseca del ovario, como son la NA y el VIP.

La producción de las hormonas esteroides ováricas es a partir del colesterol. Este proviene de tres fuentes:

- 1) De la vía sanguínea, a partir de las lipoproteínas circulantes.
- 2) El almacenado en las células ováricas, como colesterol libre o como constituyente de las membranas celulares o bien como ésteres de colesterol los cuales se encuentran en el citoplasma como gotitas de lípidos.
- 3) De la síntesis *de novo* a partir de acetato, producto del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas.

El aporte sanguíneo constituye la principal fuente de acetato de las células esteroidogénicas ováricas. Las células de la teca lo obtienen a partir de lipoproteínas de baja y alta densidad. Se sabe que en los roedores, las lipoproteínas de alta densidad son cuantitativamente más importantes, mientras que en los humanos son las de baja densidad. En la figura 4 puede observarse que la biosíntesis de esteroides se inicia en la célula de la teca con la formación de la pregnenolona, por la participación de un complejo multienzimático conformado por la citocromo P-450 scc (corte de la cadena lateral), una flavoproteína como transportadora de electrones la "flavina adenina dinucleótido" (FAD), y una proteína

de tipo hemo, que actúa como intermediaria de las dos anteriores, la luteodoxina y adrenodoxina en ovario y adrenal, respectivamente.

Posteriormente, la conversión de la pregnenolona puede seguir dos rutas alternativas: la Δ^5 donde el complejo enzimático involucrado es la citocromo P-450 17 α -hidroxilasa/17-20 liasa (P-450 c17) y la Δ^4 con el complejo microsomal Δ^5 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ Δ^5 - Δ^4 isomerasa (3 β -HSD) (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994). Estas enzimas compiten por el sustrato y en algunas especies como el cerdo, la rata y el ratón la biosíntesis sigue ambas rutas (Conley y Bird, 1997). Si la biosíntesis continúa por la ruta Δ^5 , como sucede en el humano, la pregnenolona es convertida a 17 α -hidroxipregnenolona por acción de la P-450 c17, luego a dehidroepiandrosterona y finalmente por acción de la 3 β -HSD es transformada a androstendiona (A_4). Si la esteroidogénesis sigue la ruta Δ^4 la 3 β -HSD cataliza la conversión de pregnenolona a progesterona, para luego por acción de la P-450 c17 es transformada a 17 α -hidroxiprogesteroa y posteriormente en A_4 . Ambas rutas convergen en la formación de este andrógeno. El paso limitante en la biosíntesis de los andrógenos es la expresión de la P-450 c17, la cual es estimulada por la LH. La A_4 puede ser aromatizada a estrona o bien ser transformada antes a testosterona por la acción de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y luego ser aromatizada a 17 β -estradiol. La aromatización de los andrógenos es realizada por otro complejo enzimático el citocromo P-450 aromatasa cuya síntesis depende del estímulo de la FSH. Generalmente este proceso se realiza en el retículo endoplásmico de la célula de la granulosa, una vez que los andrógenos provenientes de la teca atraviesan la membrana basal y son capturados por las células de la granulosa (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994).

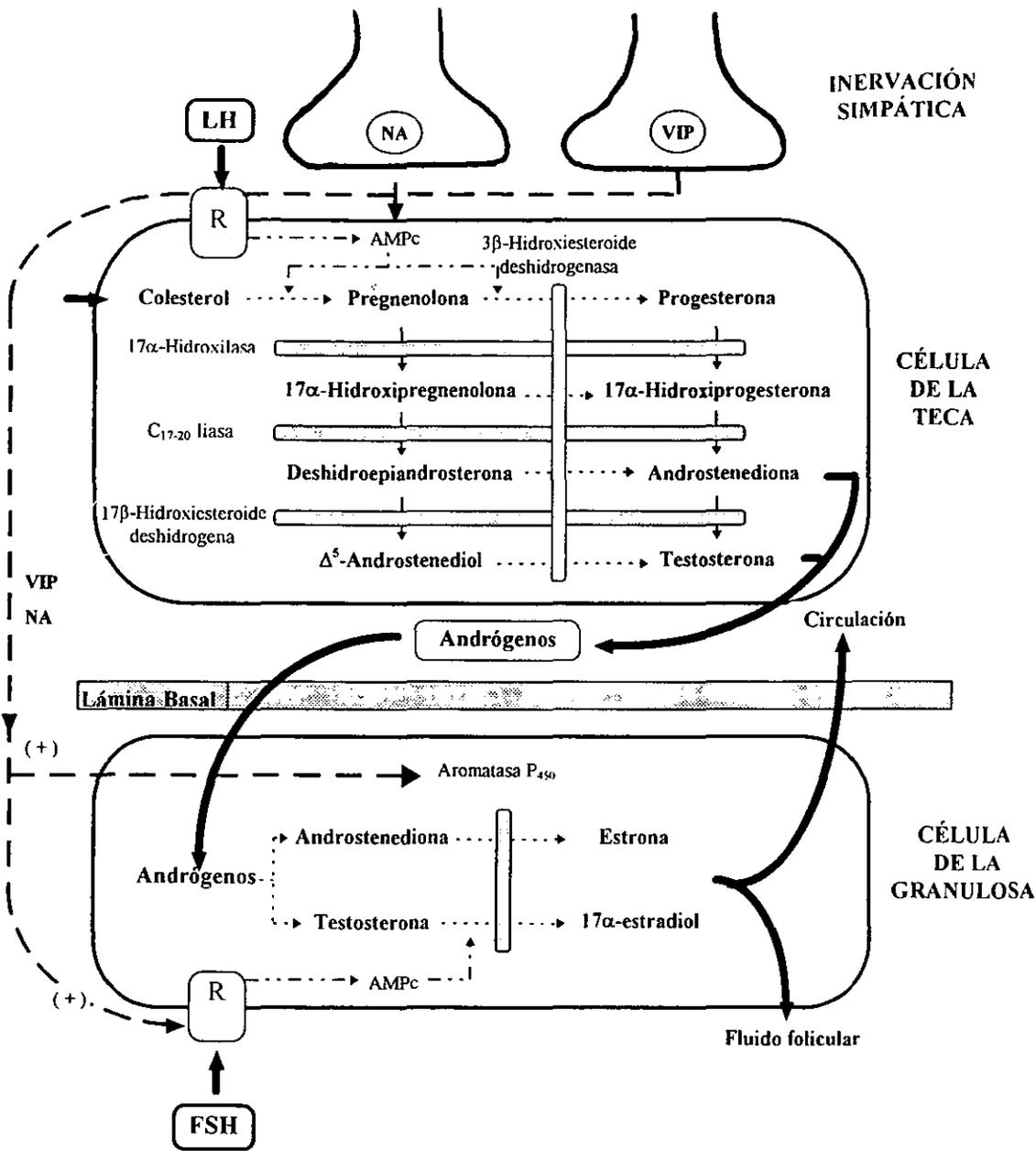


Figura 4. Rutas biosintéticas de las hormonas esteroides y la participación de la NA y el VIP en la regulación de los efectos de las gonadotropinas en las células del folículo ovárico. Modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994.

Modelos de estudio

Para estudiar la participación de la inervación en los procesos reproductivos se ha utilizado el modelo de desnervación farmacológica. Uno de los fármacos que se emplea es la guanetidina (GTD, Figura 5), un derivado de la guanidina, bloqueador de la neurona simpática (Johnson Jr. y Manning, 1984). En décadas pasadas fue muy utilizada clínicamente como un agente antihipertensivo, sin embargo numerosos grupos de investigación la utilizaron como un medio para bloquear a la neurona simpática a nivel del sistema nervioso periférico.

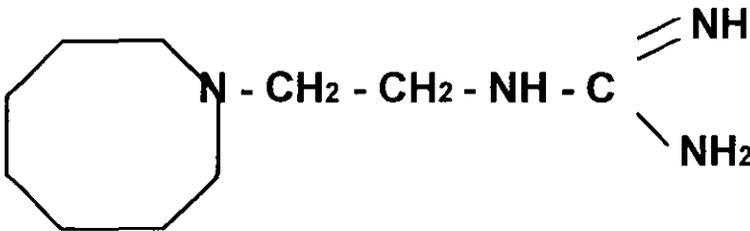


Figura 5. Estructura química de la guanetidina. Tomada de Johnson Jr. y Manning, 1984.

Guanetidina (efectos y mecanismo de acción)

A la fecha aún no está completamente esclarecido el mecanismo molecular por el cual actúa la GTD. Es incorporada por los axones noradrenérgicos a través de la bomba de recaptura de catecolaminas (Maxwell, 1982) y almacenada dentro de vesículas, las cuales pueden ser liberadas posteriormente por la llegada de un estímulo nervioso, de esta forma actúa como un falso neurotransmisor (Boullin, 1966). Una vez dentro de la neurona noradrenérgica, la GTD induce

depleción de la noradrenalina almacenada (Maxwell, 1982). Se sabe que este fármaco afecta a los organelos de la neurona; produce daño mitocondrial (hinchazón de las mitocondrias, disminución de cristales e inhibición de la fosforilación oxidativa) como uno de los eventos relativamente tempranos en respuesta a la administración de GTD. Además se observan otros cambios ultraestructurales en las neuronas como dilatación del retículo endoplásmico, disminución o ausencia de ribosomas libres, localización excéntrica del núcleo y desarrollo irregular en la forma de la membrana nuclear. En la rata se observa un infiltrado típico de células identificadas como linfocitos T, macrófagos, algunos leucocitos polimorfonucleares y algunas células plasmáticas (Manning y col., 1983). Más tarde, la GTD induce la degeneración axonal, desaparición de la neurona y proliferación de células gliales y satélites. En las neuronas del ganglio cervical superior, la GTD también provoca el rompimiento de las vainas de mielina (Kidd y col., 1992).

Manning y col., (1983) mostraron que en la rata, destrucción de la neurona simpática con GTD está involucrado un mecanismo inmune. Ellos observaron en el ganglio cervical superior, de ratas machos prepúberes denervadas con GTD, el típico infiltrado celular, disminución de la actividad de la TH y destrucción neuronal. Para probar si el sistema inmunológico está mediando la destrucción neuronal, a otro grupo de animales les deprimieron este sistema por aplicación de radiación, posteriormente se les inyectó GTD seguida de la administración de células inmunocompetentes (del bazo y del timo) obtenidas de ratas singénicas. Estos animales presentaron las mismas características que los tratados sólo con GTD. Este grupo de investigadores han planteado la hipótesis de que la GTD induce la expresión de una proteína o glicoproteína, la cual no se encuentra normalmente en la membrana plasmática de la neurona, de tal manera que esta molécula resulta ser reconocida por el sistema inmunológico como extraña (antigénica), lo que desencadena una respuesta inmunológica y por ende la destrucción de la neurona. Sin embargo, aún se desconoce exactamente todo el mecanismo celular y molecular involucrado en la acción de la GTD.

Diversos estudios han mostrado que la administración de GTD en la rata neonata o adulta , provoca disminución en las concentraciones de NA de casi todos los ganglios simpáticos periféricos y estructuras inervadas por estos: como el iris, corazón (atrios y ventrículos), vena mesentérica, arteria femoral, vejiga, nervio ciático, nervio vago y ganglio cervical superior (Aberdeen y col., 1990; Benarroch y col., 1990; Bennett y col., 1982; Eränkő y Eränkő, 1971; Krukoff y col., 1990; Schmidt y col., 1990; Zochodne y col., 1990). También se observaron alteraciones en la respuesta cardiovascular como disminución en la presión arterial sistémica, incremento del flujo sanguíneo del nervio ciático y disminución de la resistencia microvascular (Benarroch y col., 1990; Zochodne y col., 1990).

6-hidroxidopamina (efectos y mecanismo de acción)

Otro de los fármacos empleados para la destrucción de las neuronas noradrenérgicas es la 6-hidroxidopamina (6-OHDA, Figura 6) que actúa como un neurotóxico destruyendo las terminales axónicas y provocan daños similares a los de la GTD (Angeletti y col., 1972). Este neurotóxico es capturado por la terminal catecolaminérgica, mediante el mecanismo de recaptura y es almacenado en grupos de vesículas; cuando se administra a bajas concentraciones es liberado por estimulación nerviosa, de manera semejante a la GTD, mientras que a altas concentraciones genera productos muy reactivos como peróxidos, superóxidos, hidroxindoles y quinonas. Estas sustancias serían las responsables del daño producido en el retículo endoplásmico, en el núcleo y en las mitocondrias (Kostrzewa y Jacobowitz, 1974).

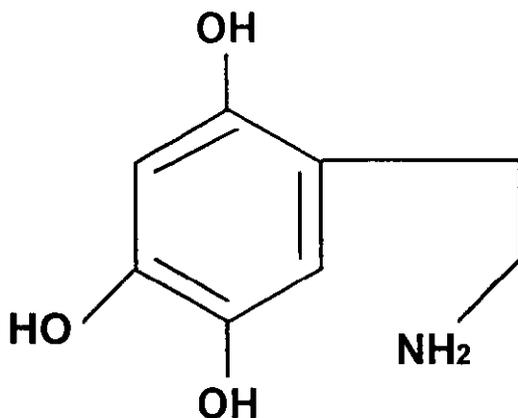


Figura 6. Estructura química de la 6-hidroxi dopamina. Tomada de Kostrzewa y Jacobowitz, 1974.

En la rata neonata la administración subcutánea o intraperitoneal de 6-OHDA provoca una drástica disminución de las concentraciones de NA en el hipotálamo y en corteza cerebral, el iris, las glándulas salivales, el ganglio cervical superior, el corazón, el bazo, la vena mesentérica y la vejiga (Aberdeen y col., 1990; Jaim-Etcheverry y Zieher, 1971; Krukoff y col., 1990; Saari y col., 1990). Por otra parte, la inyección intraventricular de 6-OHDA destruye las terminales axónicas dopaminérgicas del sistema nigrostriatal y disminuye las concentraciones de noradrenalina y dopamina (Buonamici y col., 1990; Fernandes Xavier y col., 1994; Snyder y col., 1990). La administración intraventricular de 6-OHDA a ratas de 3 días de edad provoca una hiperinervación de fibras dopaminérgicas en la substancia nigra a los 15 días de edad (Fernandes Xavier y col., 1994).

A mediados de la década de los 70's diversos autores sugirieron que la administración crónica de GTD o 6-OHDA provoca una degeneración irreversible de las neuronas simpáticas (Angeletti y col., 1972; Jaim-Etcheverry y Zieher, 1971; Johnson Jr. y col., 1976). Burnstock (1971) sugirió que la GTD causa una

degeneración selectiva de las neuronas adrenérgicas, observación que ha sido apoyada por otros trabajos subsecuentes (Evans y col., 1973, 1979; Evans y Burnstock, 1979; Heath y Burnstock, 1977). Posteriormente, estudios realizados en la rata denervada al nacimiento o en la etapa adulta, mostraron evidencias de una reinervación simpática en diversos órganos después de suspender el tratamiento. Por lo cual se ha sugerido que la denervación química no es completa ni permanente, lo que depende del órgano y de la etapa en la cual se realiza la denervación. (Bennett y col., 1982; Evans y col., 1979; Lorton y col., 1990).

El compuesto N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamina hidrocloreata (DSP-4) es otro de los fármacos utilizados para estudiar a las neuronas noradrenérgicas. Su mecanismo de acción consiste en el bloqueo del proceso de recaptura de la noradrenalina y disminución de la actividad de la dopamina- β -hidroxilasa (enzima que convierte la dopamina en noradrenalina). La administración de este fármaco a ratas perinatales o neonata induce cambios permanentes en las concentraciones de NA en diferentes regiones cerebrales semejante a lo observado con la administración de la 6-OHDA, pero a diferencia de esta no altera el desarrollo de las neuronas noradrenérgicas periféricas (Donnerer y col., 1992; Jaim-Etcheverry y Zieher, 1980).

Participación de la inervación simpática en eventos reproductivos.

La hipertrofia compensadora (Burden, 1977; Gerendai y col., 1978), el desarrollo folicular (Brink y Grob, 1973; Curry Jr. y col., 1983), el proceso de la ovulación, la ciclicidad vaginal (Bahr y col., 1974; Domínguez y Riboni, 1971) y el flujo sanguíneo (Aguado y col., 1984a) son algunas de las funciones reguladas por la información hormonal y neural que reciben las gónadas.

En la rata recién nacida la desnervación noradrenérgica con GTD provoca retraso en la edad de la apertura vaginal y aumento en la respuesta ovulatoria. En la rata adulta provoca disminución en el número de ovocitos liberados. Estas evidencias llevan a sugerir a los autores que la participación de la inervación noradrenérgica en la regulación de la ovulación es diferente en la rata prepúber y adulta. Mientras que para el animal prepúber es de tipo inhibitoria para el adulto es estimuladora (Flores y col., 1990).

Resultados similares han sido mostrados por el grupo de Lara y col. (1990a) quienes al administrar GTD a ratas de 7 días de edad, durante tres semanas, encuentran un retraso en la edad de la apertura vaginal, de la aparición del primer diestro, del crecimiento folicular asociado a una disminución en el número total de folículos. La administración de anticuerpos al NGF (inmunosimpatectomía) realizada al nacimiento también retrasa el desarrollo folicular, pero el número de folículos totales es mayor que en los animales testigo. Esta discrepancia puede explicarse por el hecho de que la inmunosimpatectomía no sólo elimina las fibras simpáticas, sino también las sensoriales (Lara y col., 1990b).

En la cobaya, la simpatectomía ovárica realizada en el día del estro, por la inyección de 6-OHDA provoca disminución de los folículos sanos, evaluados en el día 10 del ciclo estral (Curry Jr. y col., 1983). En esta misma especie, la administración de GTD desde el nacimiento o desde el día 10 de vida provoca un incremento en el número de folículos totales, así como un aumento en el diámetro promedio de los folículos medidos en la fase folicular de la primera ovulación (Riboni y col., 1998). Estos datos permiten sugerir que en la cobaya la inervación catecolaminérgica participa en la regulación del crecimiento folicular, como ya ha sido mostrado en la rata (Ayala y Domínguez, 1988) y que los efectos de su eliminación dependerán de la etapa en la cual se realice la denervación.

Se han realizado algunos estudios acerca del papel de la inervación simpática durante la etapa fetal. La inyección intraperitoneal de 6-OHDA en ratas preñadas disminuye el número de crías vivas e incrementa las reabsorciones fetales y provoca en los fetos una disminución en las concentraciones de noradrenalina ovárica (McDonald y Airaksinen, 1974). Estos hechos permiten sugerir que la 6-OHDA atraviesa la barrera placentaria y que el sistema catecolaminérgico es importante en el mantenimiento de la preñez. Por el contrario Evans y Burnstock (1979) reportan que la desnervación inducida con GTD antes y durante la preñez, no modifica su duración, ni el tamaño de la camada ni la fertilidad de las crías y sugieren que la inervación catecolaminérgica no es fundamental para el desarrollo normal de la preñez.

Con base en estos antecedentes, utilizando como modelo de estudio la rata denervada *in útero* con GTD o 6-OHDA, se decidió estudiar la participación de la inervación catecolaminérgica presente ya desde la etapa fetal, sobre el crecimiento y desarrollo del folículo ovárico, el contenido de catecolaminas ováricas e hipotalámicas y la concentración sérica de hormonas esteroideas ováricas.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Estudios experimentales que utilizaron el modelo del animal con denervación simpática realizada en diferentes etapas de la vida, demostraron que la participación de la inervación catecolaminérgica en los procesos reproductivos depende de la edad y especie del animal en estudio y de la existencia de mecanismos compensadores que se desarrollan en respuesta a la simpatectomía. A pesar de que en la rata se ha planteado que el ovario presenta fibras catecolaminérgicas en los últimos días del desarrollo fetal, pocos han sido los estudios que han tratado de dilucidar si esta inervación participa ya desde esta etapa en la regulación del funcionamiento de las gónadas. En este estudio se analizaron los efectos de la denervación farmacológica realizada desde el día 13 de preñez, sobre la diferenciación y el crecimiento del folículo ovárico, el contenido de catecolaminas ováricas e hipotálamicas y la concentración sérica de hormonas esteroideas ováricas, evaluados a diferentes tiempos posteriores a la denervación.

HIPÓTESIS

La inervación catecolaminérgica presente en las gónadas desde la etapa fetal, participa de manera estimuladora en los eventos neuroendócrinos implicados en la diferenciación y el crecimiento del folículo ovárico y en el inicio de la pubertad, por lo que la eliminación de la información catecolaminérgica provocará modificaciones las cuales dependerán del tiempo transcurrido desde la denervación.

OBJETIVOS

General

Estudiar la participación de la inervación noradrenérgica sobre los mecanismos neuroendócrinos que regulan el crecimiento del folículo ovárico y el inicio de la pubertad en la rata hembra.

Particulares

Estudiar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero*, inducida con guanetidina o 6-OHDA, sobre la proporción de crías nacidas vivas o muertas.

Analizar la participación de la inervación catecolaminérgica sobre la edad de la apertura vaginal, el primer estro y la ovulación.

Analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero* sobre las concentraciones de catecolaminas hipotalámicas.

Analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero* sobre las concentraciones séricas de estradiol, progesterona y testosterona.

Analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero* sobre el desarrollo folicular y las concentraciones de catecolaminas ováricas.

Analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero* sobre las concentraciones de catecolaminas de la médula adrenal.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras vírgenes de la cepa CII-ZV de tres meses de edad, mantenidas en condiciones convencionales de bioterio, 14 hrs de luz (5:00 a 19:00) y 10 hrs de oscuridad, agua y alimento *ad libitum*. En el día del proestro fueron colocadas con un macho de fertilidad comprobada y la presencia de espermatozoides en la vagina se consideró como día 1 de preñez. A partir del día 13 de preñez las madres fueron distribuidas en alguno de los siguientes grupos experimentales: grupo testigo y animales denervados con GTD o 6-OHDA.

En todas las ratas se registró la fecha de parición y se contó el número de crías nacidas vivas o muertas. En cada caja se dejaron 4 crías hembras y 3 crías machos con la madre hasta la edad del destete (21 días). En algunas camadas se revisaron diariamente desde el día 30 de vida hasta que presentaron canalización vaginal y se les realizó el frotis vaginal para determinar el primer estro vaginal.

GRUPO TESTIGO

Este grupo está formado por las crías cuyas madres fueron inyectadas por vía intraperitoneal con solución salina al 0.9% entre las 10:00 y 12:00 hrs a los 13, 15, 17 y 20 días de preñez.

ANIMALES DENERVADOS

Al igual que en el grupo testigo se utilizaron ratas cuyas madres fueron tratadas con el fármaco en los mismos días. En un primer grupo de animales se realizó la denervación con 20 mg/kg de peso corporal de guanetidina (GTD, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA), disuelta en una solución salina al 0.9%

administrada por vía intraperitoneal. Otro grupo fue denervado con 20 mg/kg de p.c. de 6-hidroxidopamina (6-OHDA,) disuelta en solución salina al 0.9% que contiene como antioxidante ácido ascórbico (Sigma Chemical Co., St. Louis MO., USA) en una concentración de 1 mg/ml.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Grupos de 10 animales fueron sacrificados por decapitación a los 10, 20, 30 días de edad o al presentar el primer estro vaginal. Los ovarios, el útero, las adrenales, el bazo y el timo se disecaron y pesaron en una balanza de precisión. En los animales sacrificados en el día del primer estro vaginal, se contó el número de ovocitos presentes en los oviductos con ayuda de un microscopio estereoscópico. Para el análisis morfométrico tres ovarios izquierdos de cada grupo experimental de las edades de 10 y 30 días y primer estro vaginal, se fijaron en solución de Bouin, se incluyeron en parafina, se realizaron cortes seriados a 10 μm y se tiñeron con hematoxilina-eosina. Con ayuda de un ocular micrométrico, se midió el diámetro mayor y el perpendicular a éste en todos los folículos que presentaron el ovocito con núcleo y nucleolo bien definidos; posteriormente, se calculó el diámetro promedio de los folículos medidos. Se consideró a un folículo atrésico si presentaba alguna de las siguientes características: picnosis nuclear de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa, engrosamiento de las capas de la teca folicular o alteración en el ovocito.

CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS

En algunos animales se disecaron rápidamente en frío y se pesaron los siguientes órganos: el hipotálamo, los ovarios, las glándulas suprarrenales, el bazo y el timo. Posteriormente se congelaron a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de la

determinación de catecolaminas por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El equipo utilizado consistió en una bomba isocrática (LC 250, Perkin Elmer) con una columna C18 de fase reversa. Se utilizó un detector electroquímico (LC 4C, BAS) y un integrador computarizado (1022 Perkin Elmer). Los datos del contenido de catecolaminas y sus metabolitos se expresaron en nanogramos y la concentración en nanogramos/miligramo de tejido.

Medición de catecolaminas ováricas

El ovario se pesó en una balanza de precisión (± 0.1 mg), al cual se le agregó una cantidad conocida de dihidroxibenzilamina (DHBA) como estándar interno y se homogenizó con ácido perclórico (HClO_4) frío al 0.1 M con ayuda de un sonicador a 50 ciclos /min. Posteriormente se centrifugó a -4°C durante 30 min. a 12,000 rpm. El sobrenadante se adicionó a un tubo que contenía TRIS al 0.05M con un pH de 8.6 y alúmina para extraer a las catecolaminas. Esta mezcla se agitó vigorosamente en un vortex durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se hicieron dos lavados sucesivos con agua (grado HPLC). Al precipitado se le adicionó ácido perclórico con el fin de "solubilizar" las catecolaminas y se centrifugó por un minuto a 12000 rpm. Finalmente se filtró con una membrana de poro de $0.2 \mu\text{m}$ y se inyectó la muestra al sistema. Sólo se determinaron NA y DA cuyo contenido se expresó en nanogramos y la concentración en nanogramos/mg de tejido.

Medición de catecolaminas hipotalámicas

Para la disección del hipotálamo se tomó como límite rostral al quiasma óptico, la Banda diagonal de Broca, comisura anterior y núcleo acumbens. Como límites caudales se tomó a los cuerpos mamilares (Bleier y col., 1979).

El hipotálamo se pesó en una balanza de precisión, se homogenizó con HClO₄ frío y se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 minutos a -4°C. Posteriormente, el sobrenadante se filtró y se inyectó. Se cuantificaron noradrenalina, dopamina y sus respectivos metabolitos, el ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y el ácido 3,4 - dihidroxifenilacético (DOPAC). También se determinó el contenido de serotonina (5-HT) y su metabolito, el ácido 5-hidroxí-indolacético (5-HIAA). La actividad de las neuronas monoaminérgicas se determinó mediante la siguiente fórmula propuesta por Shannon y col. (1986):

$$\text{Actividad neuronal} = \frac{[\text{Metabolito del neurotransmisor}]}{[\text{Neurotransmisor}]}$$

Medición de catecolaminas del bazo y del timo

Se realizó la determinación de NA y DA en el bazo y en el timo, como dos órganos ricamente inervados por fibras catecolaminérgicas. Estos órganos se procesaron de manera idéntica al hipotálamo cuya técnica se mencionó en el párrafo anterior.

Medición de catecolaminas suprarrenales

Las glándulas suprarrenales se pesaron en la balanza de precisión y se colocaron en un tubo eppendorf al cual se le agregó una cantidad conocida de DHBA. Posteriormente se homogenizó con HClO₄ frío y se centrifugó a 12 000 rpm durante 30 minutos a -4°C. Finalmente, el sobrenadante se filtró y se inyectó. Se cuantificó adrenalina, noradrenalina y dopamina.

CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

La cuantificación de 17β -estradiol, progesterona y testosterona se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando estuches comerciales (Coat-A-Count) con anticuerpo de conejo, anti-estradiol- I^{125} , anti-progesterona- I^{125} y anti-testosterona- I^{125} . El Coat-A-Count es un RIA de fase sólida, donde el anticuerpo específico a la hormona marcada es inmovilizado en la pared de los tubos de polipropileno. A estos tubos se les adicionó 100 μ l del suero problema y 1 ml de la hormona- I^{125} . Se agitó durante un minuto para incubarse a temperatura ambiente durante tres horas. Se decantaron los tubos y finalmente con la ayuda de un contador de centelleo gamma se determinó la cantidad de la hormona problema. Los resultados del ensayo de estradiol se expresaron en pg/ml y los de progesterona y testosterona en ng/ml.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Los resultados obtenidos sobre el peso corporal y de los órganos, la concentración de catecolaminas y de hormonas ováricas se analizaron por la prueba de análisis de varianza múltiple (ANDEVA) seguida de la prueba de Tukey. El número de ovocitos liberados, el número de folículos ováricos, la edad de apertura vaginal y la edad del primer estro vaginal se analizaron mediante la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de U de Mann-Whitney. La proporción de animales que abrieron vagina en cada uno de los días del ciclo estral y la tasa de animales ovulantes¹ se analizaron por la prueba de Fisher o de Chi-cuadrada. Se consideró a una diferencia estadísticamente significativa cuando la probabilidad fue menor o igual a 0.05.

$$^1\text{Tasa Ovulatoria \%} = \frac{\text{animales ovulantes}}{\text{total de animales}} \times 100$$

RESULTADOS

Objetivo I

Estudiar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero*, inducida con guanetidina o 6-OHDA, sobre la proporción de crías nacidas vivas o muertas.

Existe en la literatura controversia en cuanto a la importancia de la innervación catecolaminérgica en el desarrollo y supervivencia de los fetos, por lo cual se decidió analizar la participación de esta innervación sobre la proporción de crías nacidas vivas o muertas.

En la tabla 1 se muestra que la denervación catecolaminérgica, realizada al final de la preñez, inducida con 6-OHDA o GTD no modifica la duración de la preñez, ni el número de crías nacidas vivas o muertas ni la proporción entre hembras y machos.

TABLA 1. Media \pm eem de la duración de la gestación (días), del número de crías nacidas vivas o muertas, del número de hembras o machos de ratas tratadas a los 13, 15, 17 y 20 días de preñez con vehículo o 20 mg/kg i.p de guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA).

Grupo	Duración de la Gestación	Crías		Crías	
		Vivas	Muertas	Hembras	Machos
VEHÍCULO	22.2 \pm 0.2	11.2 \pm 1.1	0	4.7 \pm 0.8	6.5 \pm 1.0
GTD	22.9 \pm 0.1	11.1 \pm 0.6	0.3 \pm 0.2	5.0 \pm 0.9	6.1 \pm 1.1
6-OHDA	23.0 \pm 0	9.4 \pm 1.3	1.2 \pm 1.0	5.0 \pm 0.9	4.6 \pm 1.3

Objetivo II

Analizar la participación de la inervación catecolaminérgica sobre la edad de la apertura vaginal, el primer estro y la ovulación.

Con el propósito de estudiar si la inervación simpática presente ya desde la etapa fetal, participa en el inicio de la pubertad espontánea, se decidió analizar los efectos de la denervación farmacológica, realizada con GTD o 6-OHDA durante la etapa fetal, sobre los procesos de apertura vaginal, primer estro y ovulación.

En los animales denervados con 6-OHDA el peso corporal aumentó significativamente al nacimiento, a los 10 días de edad y al primer estro, con respecto al grupo con vehículo. Los animales tratados con GTD no presentaron diferencias significativas en el peso corporal en ninguna de las edades evaluadas (Tabla 2).

TABLA 2. Media \pm eem del peso corporal (gramos) de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

EDAD DE SACRIFICIO	VEHICULO	GTD	6-OHDA
Recién Nacido	5.0 \pm 0.2	5.7 \pm 0.2	7.0 \pm 0.2 *
10 Días	15.5 \pm 1.4	13.5 \pm 1.2	19.5 \pm 0.4 *
20 Días	38.5 \pm 2.2	34.3 \pm 1.1	33.7 \pm 1.0
30 Días	64.9 \pm 1.6	67.6 \pm 1.6	66.3 \pm 1.7
Primer Estro	104.5 \pm 2.9	108.8 \pm 2.8	115.0 \pm 2.3 *

* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

El peso de los ovarios de los animales testigo incrementa conforme aumenta la edad. No se encontraron diferencias entre el peso del ovario izquierdo y del derecho, excepto al primer estro vaginal donde el peso del ovario izquierdo fue significativamente mayor que del derecho (Tabla 3).



En los animales tratados con GTD *in útero*, el ovario derecho de los animales sacrificados a los 20 días disminuyó significativamente con respecto al inyectado con vehículo. En las hembras recién nacidas el peso del ovario derecho fue mayor respecto a su ovario contralateral. Al primer estro vaginal el peso del ovario izquierdo fue significativamente menor que el del grupo testigo, tanto en valores absolutos (Tabla 3) como expresados en función del peso corporal (GTD: 13.58 ± 1.24 vs Vehículo: 20.75 ± 1.92 ; $p < 0.05$ ANDEVA seguida por Tukey).

En los animales denervados con 6-OHDA sólo se observó disminución en el peso absoluto del ovario izquierdo en el grupo sacrificado al primer estro (Tabla 3). Al expresarse como peso relativo, la disminución no alcanza a ser estadísticamente significativa (6-OHDA: 16.10 ± 1.39 vs Vehículo: 20.75 ± 1.92 ; N.S.).

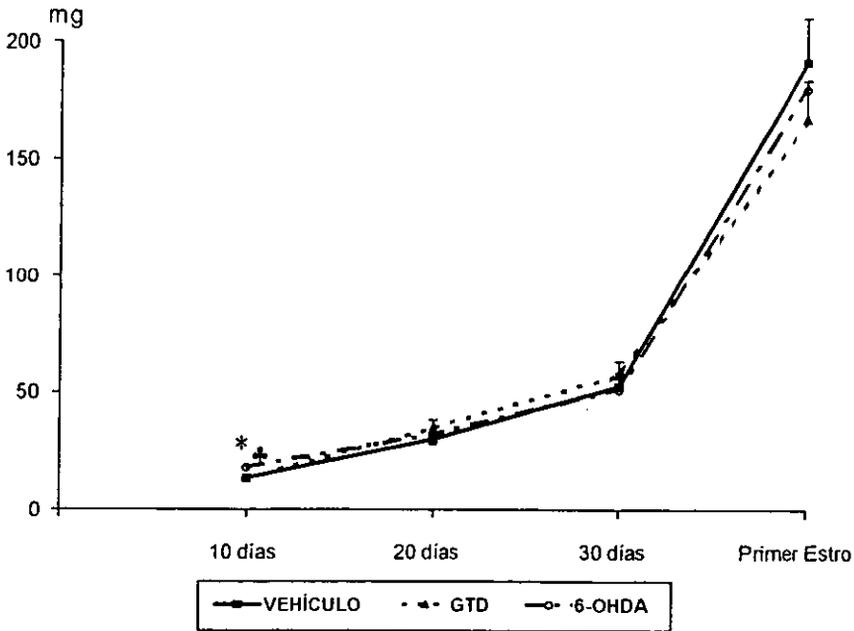
TABLA 3. Media \pm eem del peso absoluto (mg) de los ovarios izquierdo y derecho de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

EDAD DE SACRIFICIO	OVARIO	VEHÍCULO	GTD	6-OHDA
Recién Nacido	izquierdo	0.68 \pm 0.03	0.58 \pm 0.08	0.60 \pm 0.11
	derecho	0.64 \pm 0.10	0.85 \pm 0.03 \ddagger	0.70 \pm 0.09
10 Días	izquierdo	1.48 \pm 0.32	0.99 \pm 0.10	1.22 \pm 0.15
	derecho	1.32 \pm 0.13	1.18 \pm 0.05	1.30 \pm 0.17
20 Días	izquierdo	5.80 \pm 0.57	4.36 \pm 0.57	4.99 \pm 0.27
	derecho	5.70 \pm 0.72	3.56 \pm 0.38 *	4.92 \pm 0.49
30 Días	izquierdo	9.87 \pm 1.53	8.17 \pm 0.60	8.23 \pm 0.38
	derecho	9.83 \pm 0.79	8.48 \pm 0.62	7.56 \pm 0.96
Primer Estro	izquierdo	25.05 \pm 3.14 \ddagger	14.88 \pm 1.52 *	15.73 \pm 1.63 *
	derecho	15.30 \pm 1.68	20.11 \pm 3.02	15.31 \pm 1.12

* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

\ddagger $p < 0.05$ vs su ovario contralateral (ANDEVA seguida por Tukey).

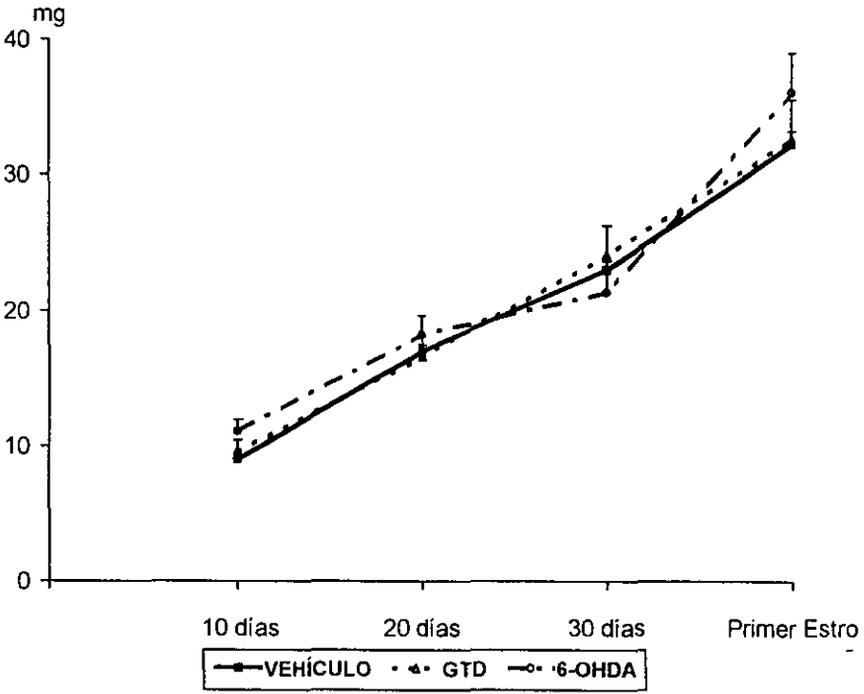
La denervación catecolaminérgica realizada con GTD no modificó el peso del útero en ninguna de las edades evaluadas. La denervación con 6-OHDA provocó incremento en el peso absoluto de este órgano a los 10 días de edad, con respecto a los otros dos grupos experimentales (Gráfica 1). Este incremento no se observó cuando el peso del útero se expresó en función del peso corporal (6-OHDA: 10.4 ± 1.1 vs Vehículo: 8.8 ± 0.5).



* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).
 ▲ $p < 0.05$ vs GTD (ANDEVA seguida por Tukey).

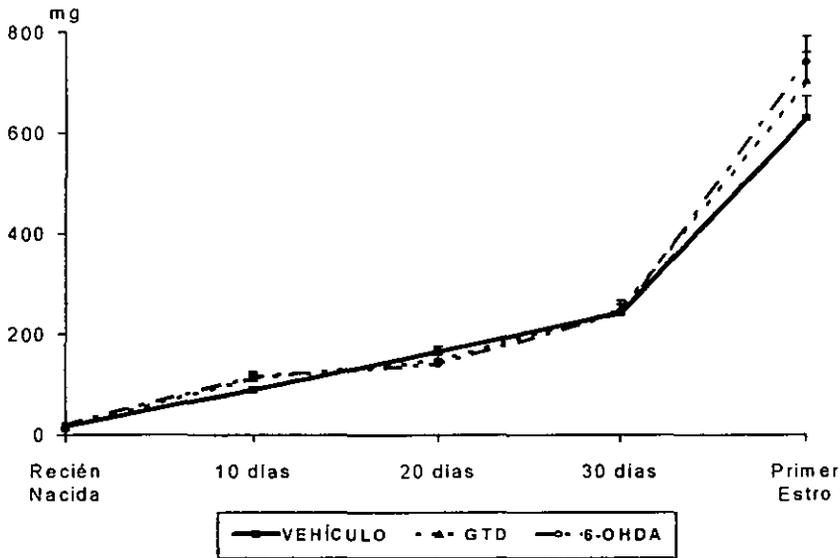
GRÁFICA 1. Media \pm eem del peso absoluto (mg) del útero de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

La masa adrenal no presentó diferencias significativas con respecto al grupo testigo en ninguno de los tratamientos (Gráfica 2).

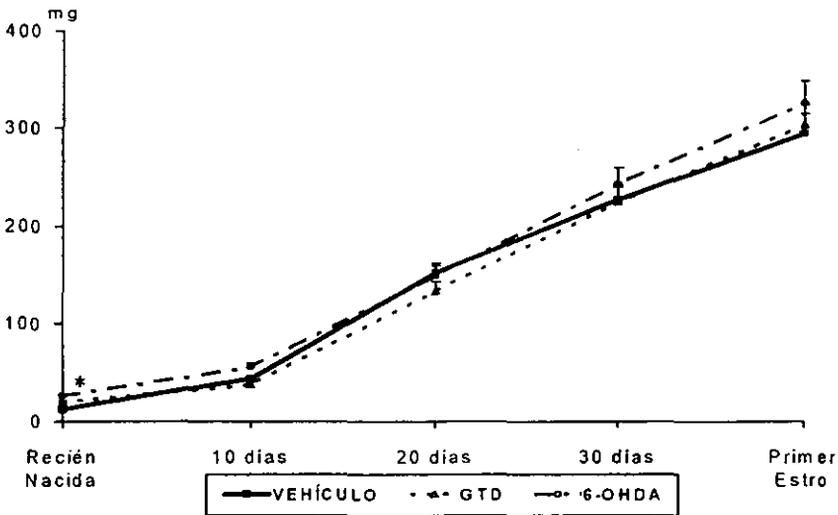


GRÁFICA 2. Media ± eem del peso absoluto (mg) de la masa adrenal de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

En la gráfica 3 se observa que la denervación catecolaminérgica ya sea con GTD o 6-OHDA no modificó el desarrollo ponderal del bazo. La administración de GTD o 6-OHDA provocó en los animales recién nacidos aumento del peso absoluto del timo respecto al grupo testigo (Gráfica 4). Este incremento se mantiene cuando el peso se expresa como peso relativo (GTD: 34.8 ± 2.0 , 6-OHDA: 37.6 ± 1.8 vs Vehículo: 23.9 ± 1.8 ; $p < 0.05$, ANDEVA seguida por Tukey).



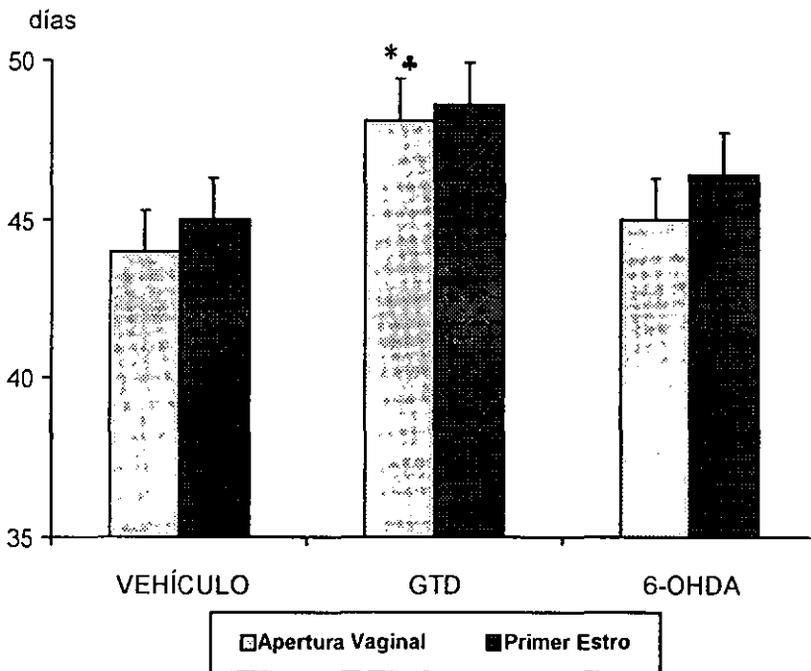
GRÁFICA 3. Media \pm eem del peso absoluto (mg) del bazo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.



* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

GRÁFICA 4. Media \pm eem del peso absoluto (mg) del timo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

La denervación con GTD en la etapa fetal provocó retraso en la edad de la apertura vaginal y no se modificó cuando la simpatectomía fue realizada con 6-OHDA. La edad del primer estro vaginal no se modificó por la denervación catecolaminérgica realizada con GTD o 6-OHDA (Gráfica 5). Al momento de la canalización vaginal el 75% de los animales que fueron inyectados con vehículo durante la etapa fetal, presentaron un frotis vaginal en estro. Este mismo patrón se presentó en los animales denervados (GTD: 87.5%; 6-OHDA: 50%).



* $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).
 ♣ $p < 0.05$ vs 6-OHDA (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).

GRÁFICA 5. Media \pm eem de la edad (días) de la edad de la apertura vaginal y del primer estro de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas al primer estro vaginal.

La denervación catecolaminérgica *in útero*, inducida con GTD o 6-OHDA, no modificó el porcentaje de animales ovulantes ni la cuota ovulatoria. Cuando se analizaron el número de ovocitos liberados por cada uno de los ovarios se observó que en el grupo con 6-OHDA el ovario izquierdo liberó significativamente más ovocitos que el del grupo testigo (Tabla 4).

TABLA 4. Porcentaje de animales ovulantes y media \pm eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o por ambos ovarios de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas al primer estro vaginal.

Grupo	n	Tasa Ovulatoria	Ovocitos Liberados por el Ovario:		
			Izquierdo	Derecho	Totales
VEHÍCULO	10	87.5 %	2.6 \pm 0.6	3.7 \pm 0.9	6.3 \pm 1.2
GTD	10	100 %	4.0 \pm 0.8	3.1 \pm 0.8	7.1 \pm 0.6
6-OHDA	10	100 %	5.1 \pm 0.6 *	2.4 \pm 0.6	7.5 \pm 0.7

* P<0.05 vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

Para asegurar de que los fármacos utilizados atraviesan la barrera placentaria y ejercen su efecto, se cuantificó la concentración de NA y DA en dos órganos que presentan una rica inervación catecolaminérgica, como en el caso del bazo y del timo.

La administración de GTD, durante la vida fetal, provocó al nacimiento una depleción en la concentración de NA del bazo pero no en el timo, sin cambio en las concentraciones de dopamina. La administración de 6-OHDA no modificó las concentraciones de catecolaminas del bazo pero sí en el timo donde la concentración de DA estuvo por debajo de la sensibilidad del método (Tabla 5).

TABLA 5. Media \pm eem de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y dopamina (DA) del bazo y del timo de ratas tratadas durante la etapa fetal, con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas al nacimiento.

GRUPO	BAZO		TIMO	
	NA	DA	NA	DA
VEHÍCULO	0.382 \pm 0.029	0.083 \pm 0.004	0.221 \pm 0.137	0.163 \pm 0.070
GTD	N.D.	0.094 \pm 0.007	0.047 \pm 0.019	0.121 \pm 0.018
6-OHDA	0.342 \pm 0.127	0.071 \pm 0.022	0.170 \pm 0.084	N.D.

N.D. No detectable, por debajo de la sensibilidad del método.

Objetivo III

Analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero*, sobre las concentraciones de catecolaminas hipotalámicas.

Existen evidencias de que la barrera hematoencefálica aún no es completamente funcional o "madura" al nacimiento. Por lo anterior, se decidió analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica, realizada durante la etapa fetal, sobre las concentraciones de catecolaminas del hipotálamo en diferentes etapas del desarrollo.

Sistema noradrenérgico

En el hipotálamo de los animales recién nacidos se observó la presencia de noradrenalina y su metabolito, pero no fue posible separarlos y cuantificarlos. En los animales tratados con GTD y sacrificados a los 10, 20 días y al primer estro no se encontraron diferencias en el contenido de noradrenalina hipotalámica mientras que a los 30 días de edad, el contenido de la monoamina es significativamente mayor con respecto al grupo testigo. En el grupo con administración de 6-OHDA no se encontraron cambios en el contenido de NA hipotalámica en ninguna de las edades evaluadas (Tabla 6).

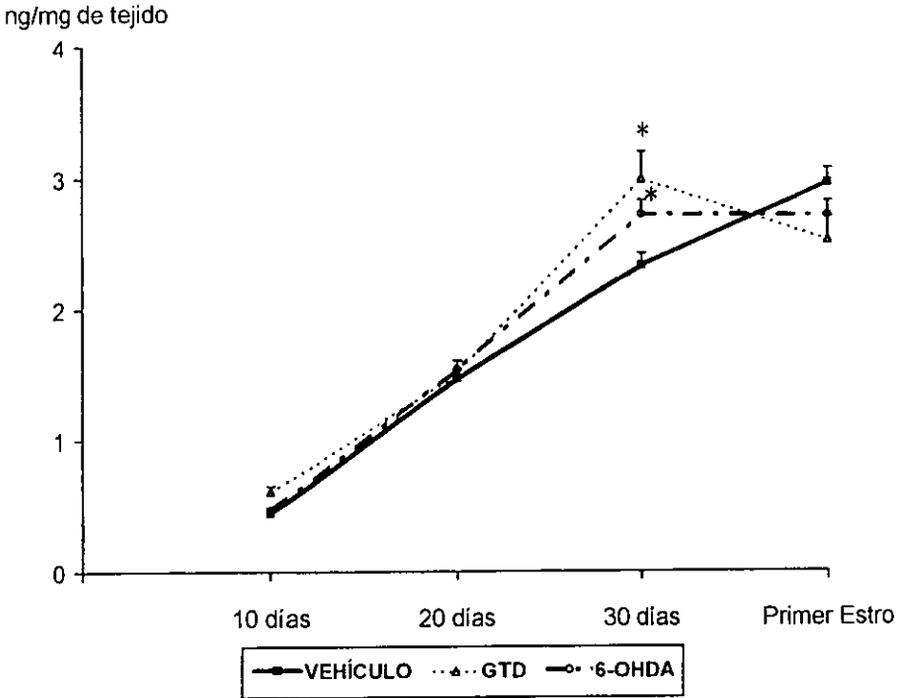
Tabla 6. Media \pm eem del contenido (ng) de noradrenalina (NA) del hipotálamo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

Grupo	Recién Nacidos	10 días	20 días	30 días	Primer Estro
VEHÍCULO	N.C.	5.7 \pm 0.8	23.9 \pm 1.8	40.1 \pm 3.0	72.1 \pm 11.3
GTD	N.C.	10.1 \pm 3.5	25.5 \pm 3.0	64.3 \pm 4.6 *	56.2 \pm 2.2
6-OHDA	N.C.	6.9 \pm 0.5	24.2 \pm 1.7	48.3 \pm 2.8	55.2 \pm 4.7

N.C. No cuantificable.

* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

En la gráfica 6 se muestran los resultados de las concentraciones de noradrenalina hipotalámica. En los animales denervados con GTD o 6-OHDA y sacrificados a los 30 días de edad presentaron incremento significativo en la concentración de NA. En las otras edades evaluadas no se encontraron modificación en la concentración del neurotransmisor. Cabe mencionar que debido a un problema en la separación de la noradrenalina y de su metabolito (MHPG) no fue posible determinar la actividad de este sistema.



* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA) seguida por Tukey.

Gráfica 6. Media \pm eem de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) del hipotálamo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

Sistema dopaminérgico

El contenido y la concentración de dopamina en el hipotálamo de animales tratados con 6-OHDA sólo se modificó en los animales recién nacidos, en los cuales estuvieron por debajo de la sensibilidad del método. En el grupo tratado con GTD durante la etapa fetal, no se modificó este sistema de neurotransmisión en las diferentes edades evaluadas. Sin embargo, al primer estro vaginal la concentración de DA del grupo con GTD fue significativamente mayor en comparación sólo con el grupo tratado con 6-OHDA (Tabla 7 y Gráfica 7a).

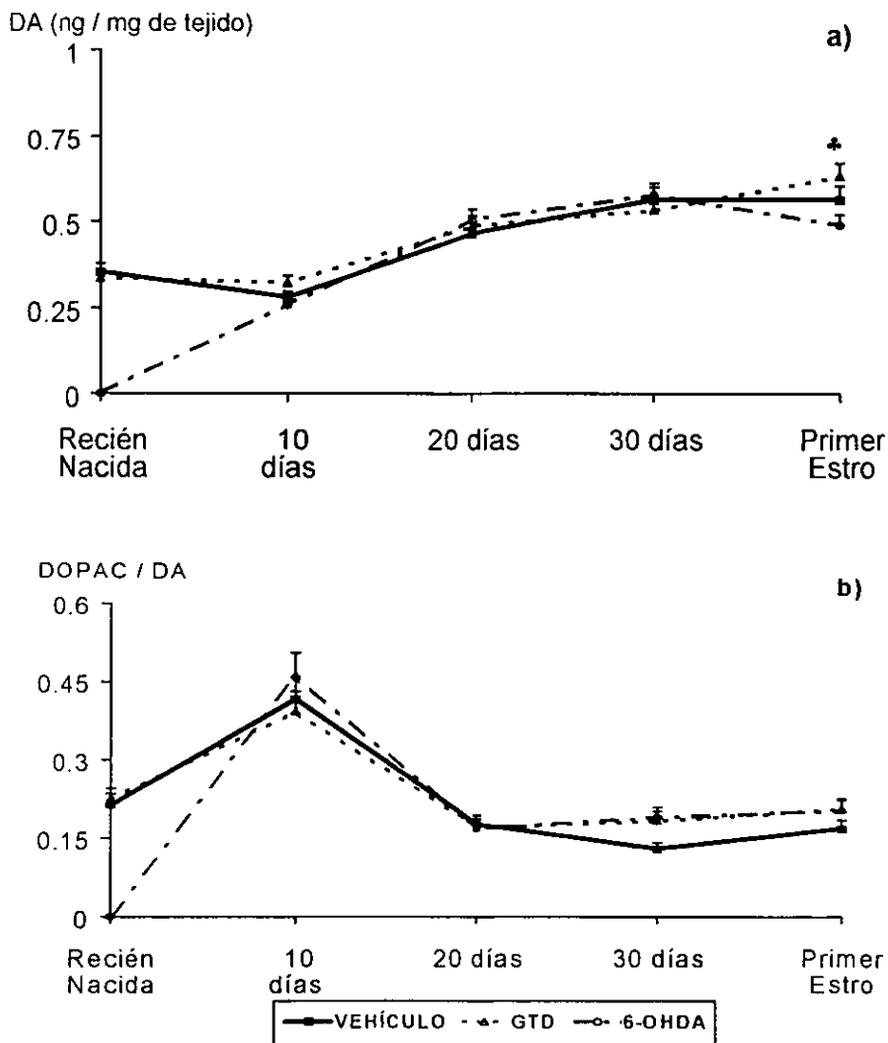
Tabla 7. Media \pm eem del contenido (ng) de dopamina (DA) del hipotálamo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehiculo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

Grupo	Recién Nacidos	10 días	20 días	30 días	Primer Estro
VEHÍCULO	4.9 \pm 0.9	3.5 \pm 0.3	7.9 \pm 0.7	9.9 \pm 1.1	13.7 \pm 2.3
GTD	4.6 \pm 0.7	3.1 \pm 0.2	8.2 \pm 0.8	11.4 \pm 0.6	14.1 \pm 1.2 *
6-OHDA	N.D.	3.6 \pm 0.3	8.0 \pm 0.8	10.3 \pm 0.9	10.3 \pm 1.5

* p<0.05 vs6-OHDA (ANDEVA seguida por Tukey).

N.D. no detectable, por debajo de la sensibilidad del método.

En los animales denervados *in útero* no se modificó la actividad del sistema dopaminérgico en ninguna de las edades evaluadas (Gráfica 7 b).



* $p < 0.05$ vs 6-OHDA (ANDEVA seguida por Tukey).

Gráfica 7 (a, b). Media \pm eem de la concentración (ng/mg de tejido) de dopamina (DA) y de la actividad de la neurona dopaminérgica (DOPAC/DA) en el hipotálamo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

Sistema Serotoninérgico

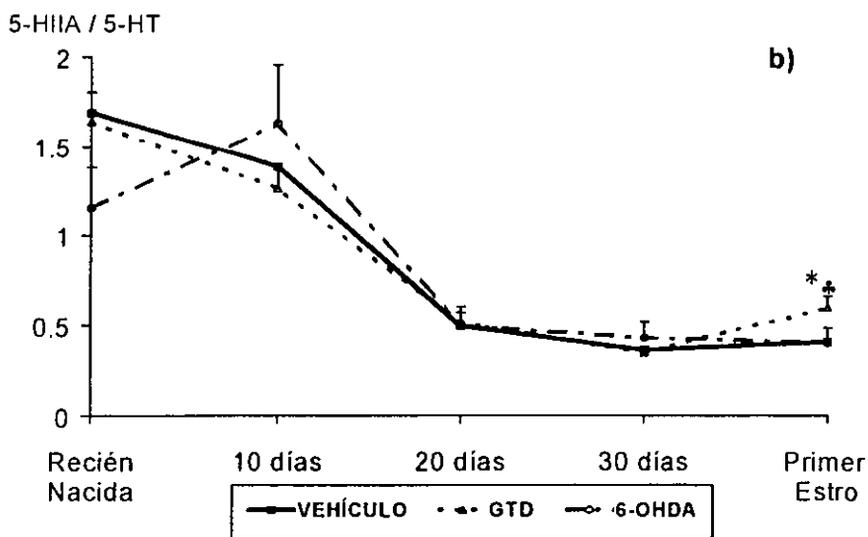
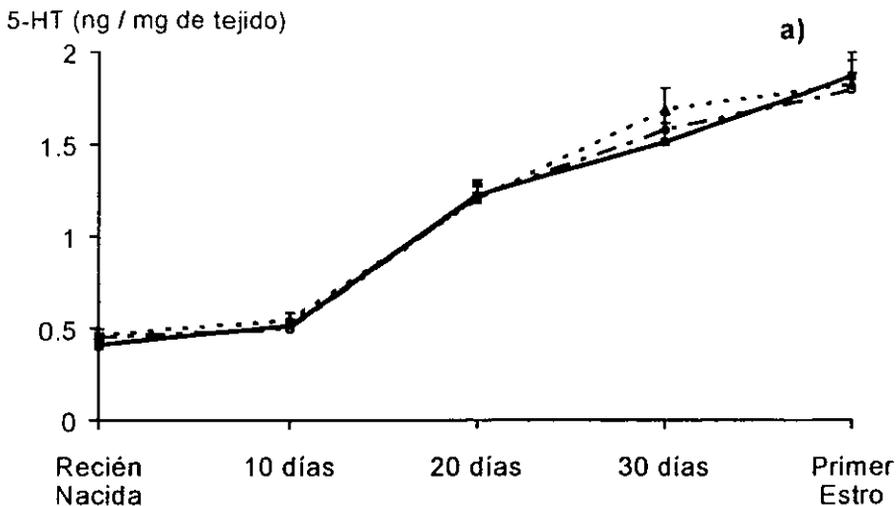
La denervación catecolaminérgica inducida con GTD provocó un incremento en el contenido de 5-HT a los 30 días de edad. En los animales tratados con 6-OHDA no se encontraron cambios significativos en el contenido de este neurotransmisor (Tabla 8).

Tabla 8. Media \pm eem del contenido (ng) de serotonina (5-HT) del hipotálamo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

Grupo	Recién Nacidos	10 días	20 días	30 días	Primer Estro
VEHÍCULO	5.8 \pm 0.9	6.8 \pm 0.8	21.3 \pm 2.4	26.6 \pm 2.1	45.4 \pm 6.3
GTD	5.9 \pm 0.7	5.9 \pm 1.0	20.3 \pm 3.4	37.5 \pm 3.5 *	40.9 \pm 1.7
6-OHDA	3.5 \pm 0.9	6.9 \pm 0.7	19.9 \pm 2.5	28.7 \pm 2.9	37.9 \pm 5.7

* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

En la gráfica 8 (a, b) se observa que ni la concentración de serotonina, ni la actividad de la neurona se modificaron por la administración de 6-OHDA. En los animales tratados con GTD y sacrificados al primer estro vaginal, se incrementó la actividad del sistema con respecto al grupo testigo y al tratado con 6-OHDA.



* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

♣ $p < 0.05$ vs 6-OHDA (ANDEVA seguida por Tukey).

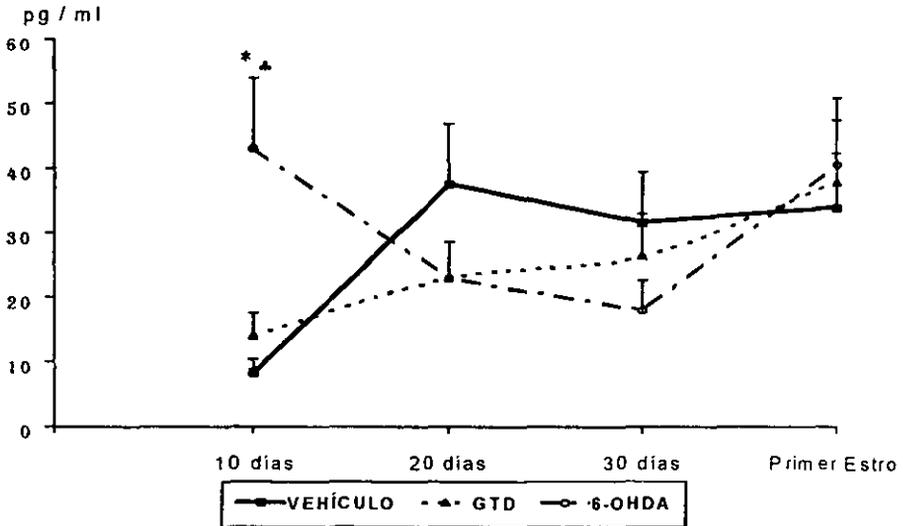
Gráfica 8 (a, b). Media \pm eem de la concentración (ng/mg de tejido) de serotonina (5-HT) y de la actividad de la neurona serotoninérgica (5-HIAA/5-HT) del hipotálamo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

Objetivo IV

Analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero*, sobre las concentraciones séricas de estradiol, progesterona y testosterona.

Con el propósito de analizar si la falta de información catecolaminérgica desde la etapa fetal modifica la esteroidogénesis, se decidió evaluar los efectos de la denervación química sobre las concentraciones séricas de estradiol, progesterona y testosterona a diferentes edades.

La administración de GTD no modificó las concentraciones séricas de E_2 en ninguna de las edades evaluadas, mientras que la administración de 6-OHDA indujo incremento significativo de esta hormona sólo a los 10 días de edad en comparación a los grupos con vehículo y tratado con GTD (Gráfica 9).

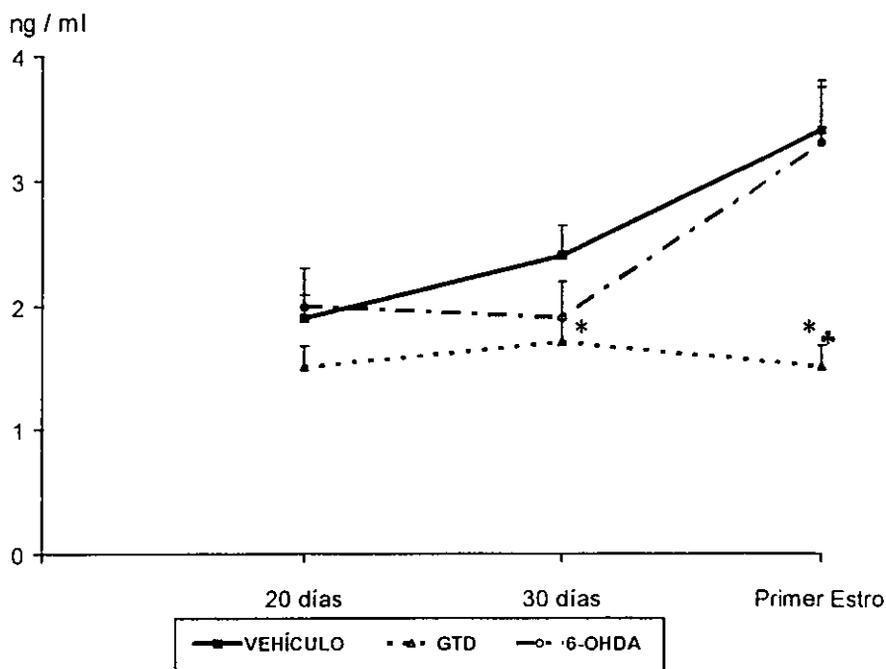


* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

* $p < 0.05$ vs GTD (ANDEVA seguida por Tukey).

Gráfica 9. Media \pm eem de la concentración sérica (pg/ml) de estradiol de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

En los animales denervados con GTD la concentración sérica de P_4 permaneció baja y es estadísticamente significativa desde los 30 días de edad. Por otra parte, en los animales tratados con 6-OHDA no se modificaron las concentraciones séricas de esta hormona, con respecto al grupo testigo (Gráfica 10).

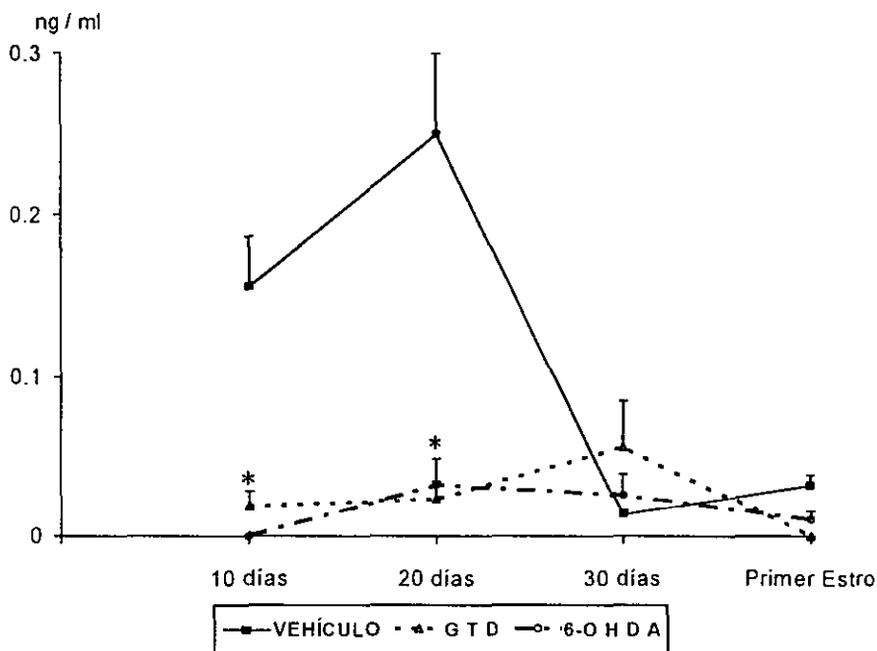


* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA) seguida por Tukey.

* $p < 0.05$ vs 6-OHDA (ANDEVA) seguida por Tukey.

Gráfica 10. Media de la concentración sérica (ng/ml) de Progesterona de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

En los animales denervados con GTD o 6-OHDA la concentración sérica de testosterona disminuyó significativamente a los 10 y 20 días de edad. En las hembras tratadas con GTD y sacrificadas al primer estro vaginal, la concentración de la hormona estuvo por debajo de la sensibilidad del método (Gráfica 11).



* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

Gráfica 11. Media \pm eem de la concentración sérica (ng/ml) de testosterona de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

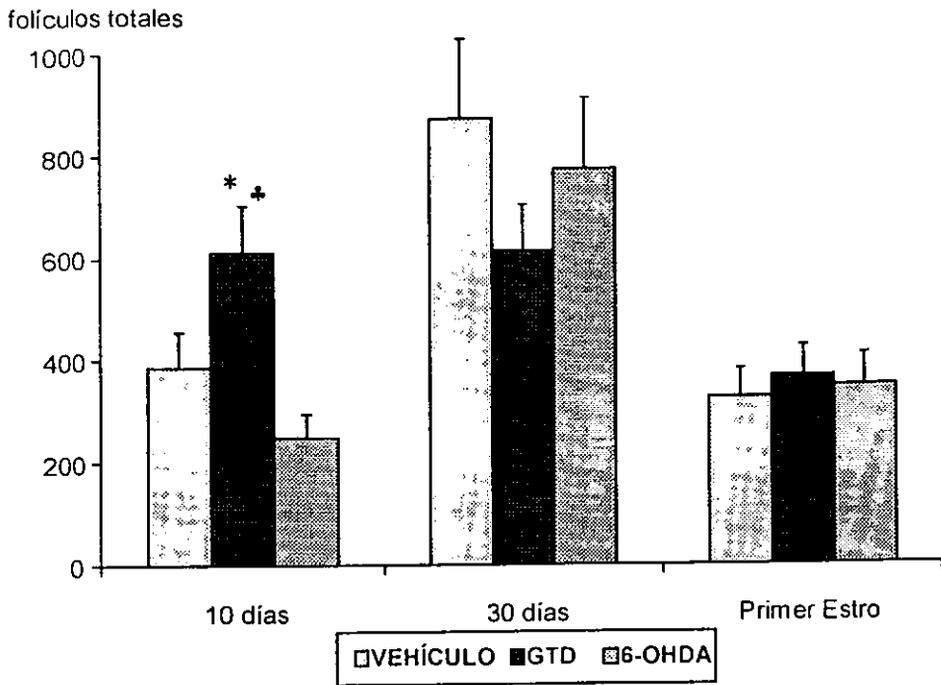
Objetivo V

Analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero*, sobre el desarrollo folicular y las concentraciones de catecolaminas ováricas.

Para analizar si la información catecolaminérgica, presente en las gónadas desde las últimas etapas del desarrollo fetal, modula el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico, se decidió estudiar los efectos de la denervación farmacológica realizada con GTD o 6-OHDA durante la etapa fetal, sobre la distribución de la población folicular y las concentraciones de catecolaminas ováricas.

Crecimiento Folicular

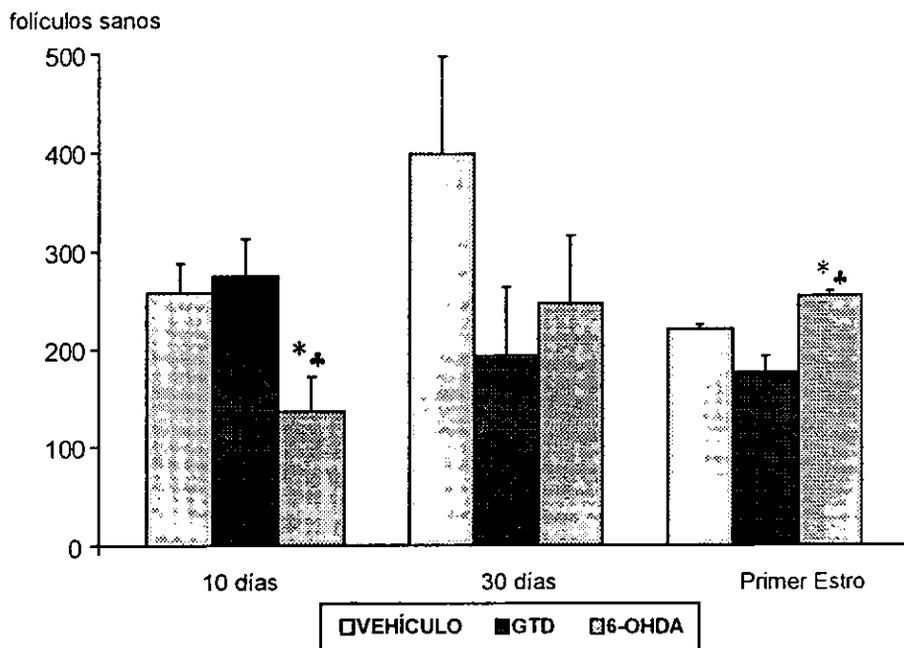
En la gráfica 12 se muestra el efecto de la simpatectomía química realizada con GTD o 6-OHDA sobre el número total de folículos del ovario izquierdo en las diferentes edades evaluadas. En los animales tratados con GTD se observó incremento en el número total de folículos sólo a los 10 días de edad, con respecto al grupo con vehículo o tratado con 6-OHDA. La administración *in útero* de 6-OHDA no indujo cambios significativos en ninguna de las edades evaluadas.



* $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).
 ♣ $p < 0.05$ vs 6-OHDA (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).

Gráfica 12. Media \pm eem del número total de folículos del ovario izquierdo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

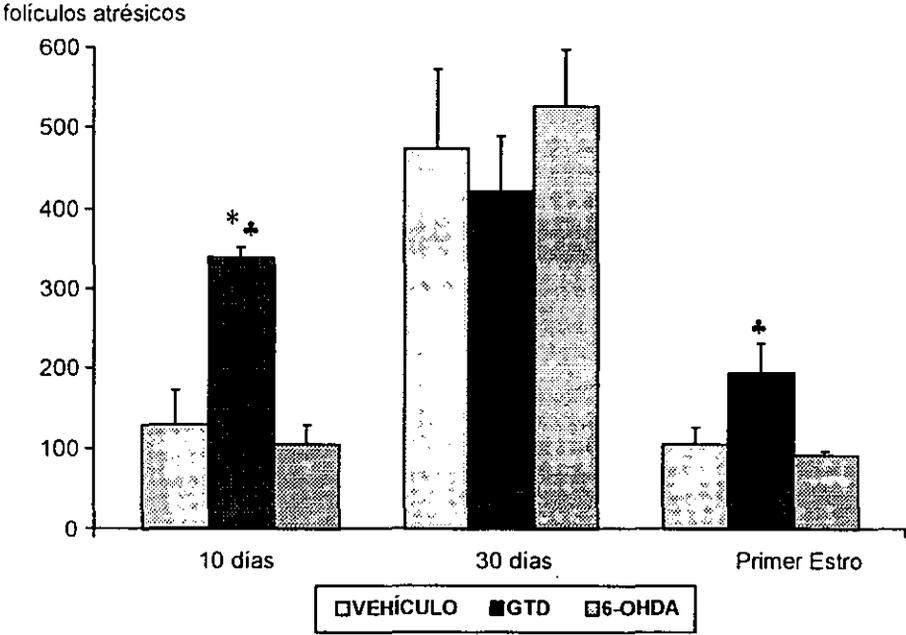
En los animales tratados con GTD no se modificó el número de folículos sanos en ninguna de las edades evaluadas. Sin embargo en los tratados con 6-OHDA se observó disminución a los 10 días de edad e incremento cuando los animales fueron sacrificados al primer estro vaginal (Gráfica 13).



* $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).
 ‡ $p < 0.05$ vs 6-OHDA (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).

Gráfica 13. Media \pm eem del número total de folículos sanos del ovario izquierdo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

En cuanto al número de folículos atrésicos, únicamente el tratamiento con GTD provocó incremento en el número de estos folículos a los 10 días de edad, en comparación a los grupos con vehículo o 6-OHDA. En los animales tratados con GTD y sacrificados al primer estro vaginal, también se presentó incremento, que llegó a ser diferente sólo con respecto al grupo con 6-OHDA (Gráfica 14).



* $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).
 ♣ $p < 0.05$ vs 6-OHDA (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).

Gráfica 14. Media \pm eem del número total de folículos atrésicos del ovario izquierdo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

En la tabla 9 se analiza la población folicular en función de su diámetro; en el grupo tratado con GTD *in útero* y sacrificado a los 10 días de edad se presentó incremento en el número de folículos menores a 70 μm que no llegó a ser estadísticamente significativo con respecto al grupo con vehículo. Estos folículos en su mayoría son atrésicos (GTD: 174.3 \pm 40.6 vs Vehículo: 41.3 \pm 15.7; $p < 0.05$ Kruskal Wallis). En los animales denervados con 6-OHDA disminuyó de manera drástica el número de folículos menores a 70 μm , de los cuales la tercera parte son atrésicos. La denervación con GTD o 6-OHDA no modificó el número de folículos en crecimiento (70-350 μm).

TABLA 9. Media \pm eem del número de folículos totales distribuidos por rangos del diámetro folicular del ovario izquierdo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a los 10 días de edad.

DIAMETRO	VEHÍCULO	GTD	6-OHDA
< 70 μm	150.7 \pm 46.5	341.7 \pm 89.2 \clubsuit	28.0 \pm 11.0 *
70-200 μm	235.3 \pm 29.4	268.7 \pm 37.7	220.7 \pm 47.0
201-350 μm	0	8 ^a	0

* $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann Whitney).

\clubsuit $p < 0.05$ vs 6-OHDA (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann Whitney).

^a: presentes en un solo ovario.

En los animales tratados con GTD y sacrificados a los 30 días de edad se encontró disminución significativa sólo en los folículos de 70 a 200 μm , con respecto al grupo con vehículo. En el grupo denervado con 6-OHDA esta disminución se observó en los folículos en crecimiento de 70 a 350 μm (Tabla 10).

TABLA 10. Media \pm eem del número de folículos totales distribuidos por rangos del diámetro folicular del ovario izquierdo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a los 30 días de edad.

DIÁMETRO	VEHICULO	GTD	6-OHDA
< 70 μm	664.3 \pm 138.5	507.0 \pm 198.2	668.3 \pm 23.1
70-200 μm	144.7 \pm 20.1	69.0 \pm 13.9 *	77.7 \pm 9.1 *
201-350 μm	50.3 \pm 9.3	28.0 \pm 6.5	20.0 \pm 3.2 *
351-500 μm	13.0 \pm 3.1	9.0 \pm 2.9	6.3 \pm 0.3
> 500 μm	0.7 \pm 0.7	0.3 \pm 0.3	1.0 \pm 1.0

* $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann Whitney).

En los ovarios de los animales tratados con GTD y sacrificados al primer estro vaginal no se modificó el número de folículos analizados en función de su diámetro (Tabla 11). Sin embargo, al analizarlos por su estado de diferenciación se encontró que en los folículos menores de 70 μm disminuyó significativamente el número de folículos sanos (GTD: 103.7 \pm 0.9 vs Vehículo: 126.7 \pm 5.5; $p < 0.05$ Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney) e incrementó la cantidad de folículos

atrésicos (GTD: 122.0 ± 13.3 vs Vehículo: 54.0 ± 13.0 ; $p < 0.05$ Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney).

En las ratas tratadas con 6-OHDA se observó incremento en los folículos menores de $70 \mu\text{m}$ dado por los folículos sanos (6-OHDA: 187.0 ± 3.1 vs Vehículo: 126.7 ± 5.5 ; $p > 0.05$. Kruskal Wallis seguida por la U de Mann-Whitney), mientras que en los folículos de $201-350 \mu\text{m}$ de diámetro se presentó disminución significativa (Tabla 11)

TABLA 11. Media \pm eem del número total de folículos por rangos del diámetro folicular del ovario izquierdo de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas al primer estro vaginal.

DIAMETRO	VEHÍCULO	GTD	6-OHDA
< 70 μm	180.7 ± 13.0	225.7 ± 14.1	249.3 ± 4.2 *
70-200 μm	97.0 ± 9.2	94.3 ± 7.8	73.3 ± 3.0
201-350 μm	31.3 ± 2.6	36.7 ± 0.3	18.7 ± 2.8 * †
351-500 μm	7.3 ± 0.3	8.0 ± 0	4.7 ± 2.0
> 500 μm	8.0 ± 1.7	4.3 ± 0.3	1.0 ± 0

* $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann Whitney).

† $p < 0.05$ vs 6-OHDA (Kruskal Wallis seguida por la U de Mann Whitney).

Catecolaminas ováricas

En el grupo inyectado con vehículo, el contenido de NA ovárica se incrementó conforme con la edad del animal. Y no se observaron diferencias en el contenido de este neurotransmisor entre el ovario izquierdo y derecho en ninguna de las edades evaluadas, excepto al primer estro donde el ovario izquierdo presentó un mayor contenido con respecto al ovario derecho. En los animales tratados con GTD y sacrificados al nacimiento se observó incremento en el contenido de NA del ovario izquierdo que no alcanzó a ser estadísticamente significativo. Cuando los animales fueron sacrificados al primer estro, el contenido de NA del ovario izquierdo disminuyó significativamente respecto al grupo testigo. En las ratas denervadas con 6-OHDA y sacrificadas al primer estro también se observó una caída en el contenido de la amina por parte del ovario izquierdo (Tabla 12).

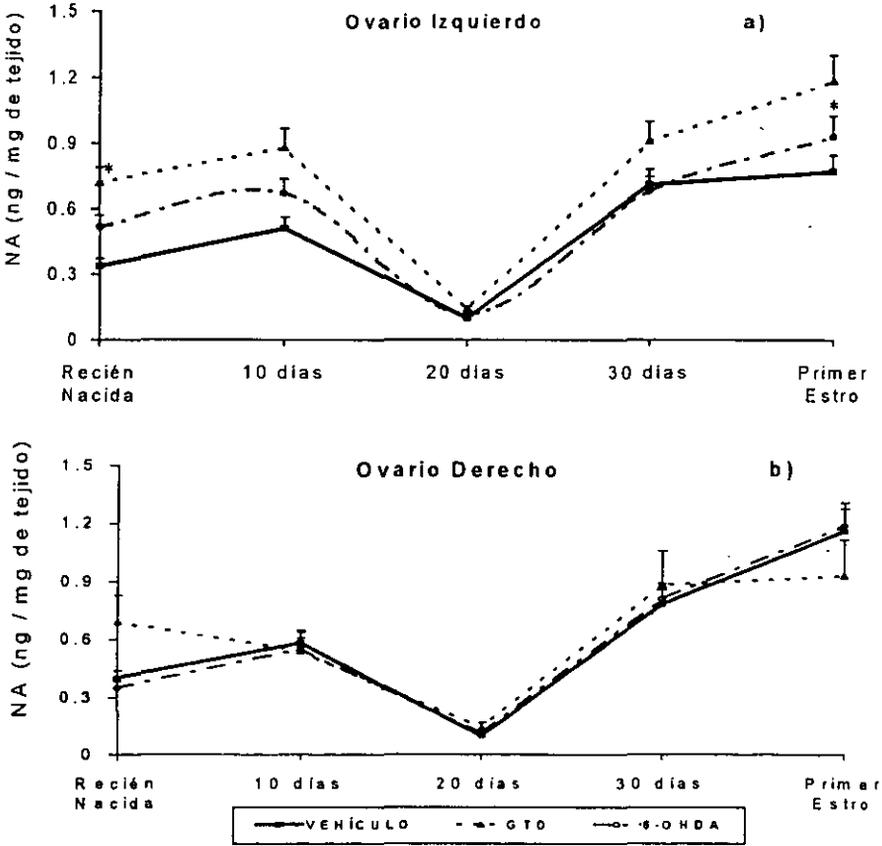
TABLA 12. Media \pm eem del contenido (ng) de noradrenalina del ovario izquierdo (OI) y derecho (OD) de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

EDAD DE SACRIFICIO	VEHÍCULO	GTD	6-OHDA
Recién Nacidos	OI 0.23 \pm 0.05	0.40 \pm 0.05	0.38 \pm 0.14
	OD 0.22 \pm 0.01	0.59 \pm 0.27	0.25 \pm 0.11
10 Días	OI 0.91 \pm 0.15	0.82 \pm 0.15	0.79 \pm 0.12
	OD 0.81 \pm 0.07	0.65 \pm 0.12	0.69 \pm 0.12
20 Días	OI 0.64 \pm 0.19	0.74 \pm 0.12	0.60 \pm 0.22
	OD 0.57 \pm 0.15	0.45 \pm 0.16	0.59 \pm 0.22
30 Días	OI 6.73 \pm 0.75	7.35 \pm 0.45	5.66 \pm 0.65
	OD 7.65 \pm 0.95	7.39 \pm 0.45	6.01 \pm 0.71
Primer Estro	OI 22.65 \pm 1.17 \clubsuit	16.28 \pm 2.24*	14.36 \pm 1.22
	OD 16.29 \pm 0.81	17.41 \pm 0.70	*17.60 \pm 0.81

* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

\clubsuit $p < 0.05$ vs su ovario derecho (ANDEVA seguida por Tukey).

En el ovario izquierdo de los animales tratados con GTD y sacrificados al nacimiento, a los 10 días de edad o al primer estro, la concentración de NA fue mayor siendo estadísticamente significativa sólo al nacimiento. Este mismo comportamiento presentó el ovario izquierdo de los animales tratados con 6-OHDA, excepto que el incremento fue significativo sólo al primer estro vaginal (Gráfica 15a). En el ovario derecho, no se modificó la concentración de NA por efecto de la denervación con GTD o 6-OHDA (Gráfica 15b).



* p < 0.05 vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

Gráfica 15 (a, b). Media ± eem de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) del ovario izquierdo y derecho de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

En el grupo con vehículo a los 30 días el contenido de DA del ovario derecho fue significativamente menor con respecto al izquierdo. La administración de GTD no modificó el contenido de DA en el ovario izquierdo ni del derecho en ninguna de las edades evaluadas. La 6-OHDA, al igual que la GTD, no provocó diferencias en el contenido del neurotransmisor excepto a los 30 días de edad donde se depletó en ambos ovarios. En los grupos con denervación no se observaron diferencias en el contenido de DA entre el ovario izquierdo y derecho (Tabla 13).

TABLA 13. Media \pm eem del contenido (ng) de dopamina del ovario izquierdo (OI) y derecho (OD) de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

EDAD DE SACRIFICIO	VEHÍCULO	GTD	6-OHDA
Recién Nacidos	OI 0.25 \pm 0.05	0.22 \pm 0.02	0.20 \pm 0.04
	OD 0.20 \pm 0.03	0.31 \pm 0.05	0.19 \pm 0.02
10 Días	OI 0.50 \pm 0.07	0.44 \pm 0.08	0.42 \pm 0.03
	OD 0.54 \pm 0.03	0.33 \pm 0.13	0.44 \pm 0.06
20 Días	OI 0.10 \pm 0.04	0.08 \pm 0.02	0.08 \pm 0.03
	OD 0.07 \pm 0.02	0.04 \pm 0.01	0.08 \pm 0.03
30 Días	OI 1.13 \pm 0.05	1.72 \pm 0.65	N.D.
	OD 0.52 \pm 0.22*	0.69 \pm 0.11	N.D.
Primer Estro	OI 0.63 \pm 0.05	1.22 \pm 0.31	0.83 \pm 0.24
	OD 0.61 \pm 0.08	0.64 \pm 0.09	1.17 \pm 0.32

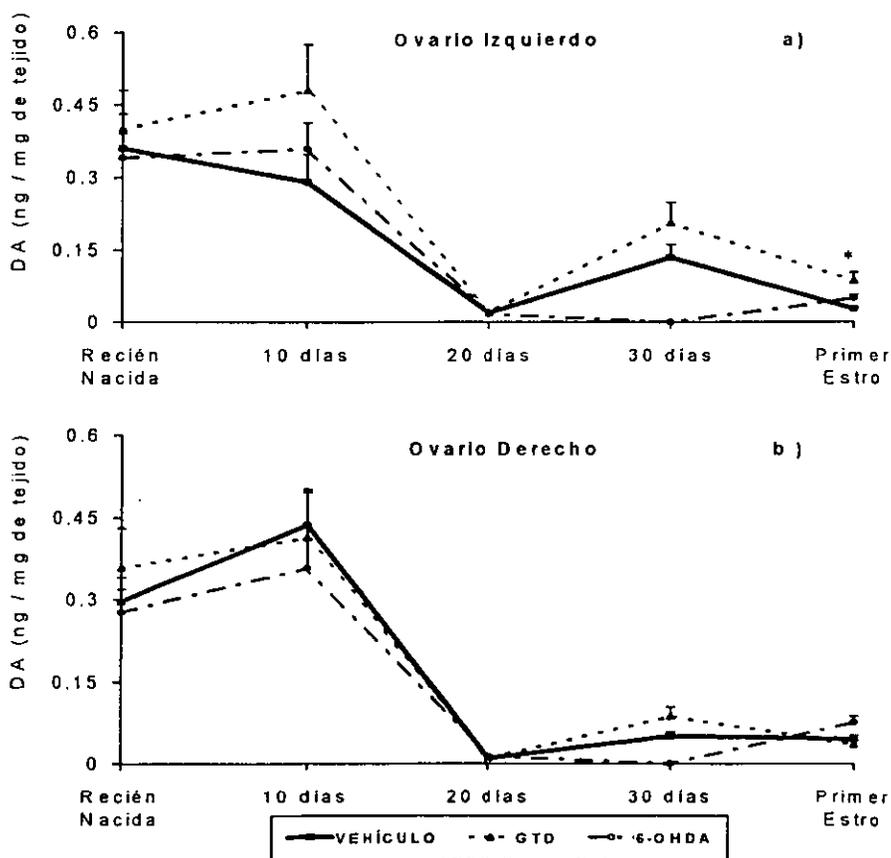
* P<0.05 vs su ovario izquierdo (ANDEVA seguida por Tukey).

N.D. No detectable, por debajo de la sensibilidad del método.

En el ovario izquierdo de los animales tratados con GTD la concentración de DA presentó tendencia a incrementarse con respecto al grupo testigo, que solamente alcanzó a ser estadísticamente significativa al primer estro

vaginal. En el grupo con 6-OHDA y sacrificado a los 30 días de edad se depletó el neurotransmisor (Gráfica 16a).

En el ovario derecho de los animales denervados con GTD o 6-OHDA no se observaron modificaciones en la concentración de DA. Sólo en los tratados con 6-OHDA y sacrificados a los 30 días de edad la concentración del neurotransmisor se encontró por debajo de la sensibilidad del método (Gráfica 16b).



* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

Gráfica 16 (a, b). Media \pm eem de la concentración (ng/mg de tejido) de dopamina (DA) del los ovario izquierdo y derecho de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a diferentes edades.

Objetivo VI

Analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica *in útero*, sobre las concentraciones de catecolaminas de la médula adrenal.

Dado que la administración de GTD o 6-OHDA no depletó las concentraciones de catecolaminas ováricas al nacimiento y que existen evidencias que muestran que la simpatectomía química periférica induce un incremento en la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa de la médula adrenal, se decidió analizar los efectos de la denervación catecolaminérgica, realizada durante la etapa fetal, sobre las concentraciones de catecolaminas de la médula adrenal al nacimiento y a los 10 días de edad.

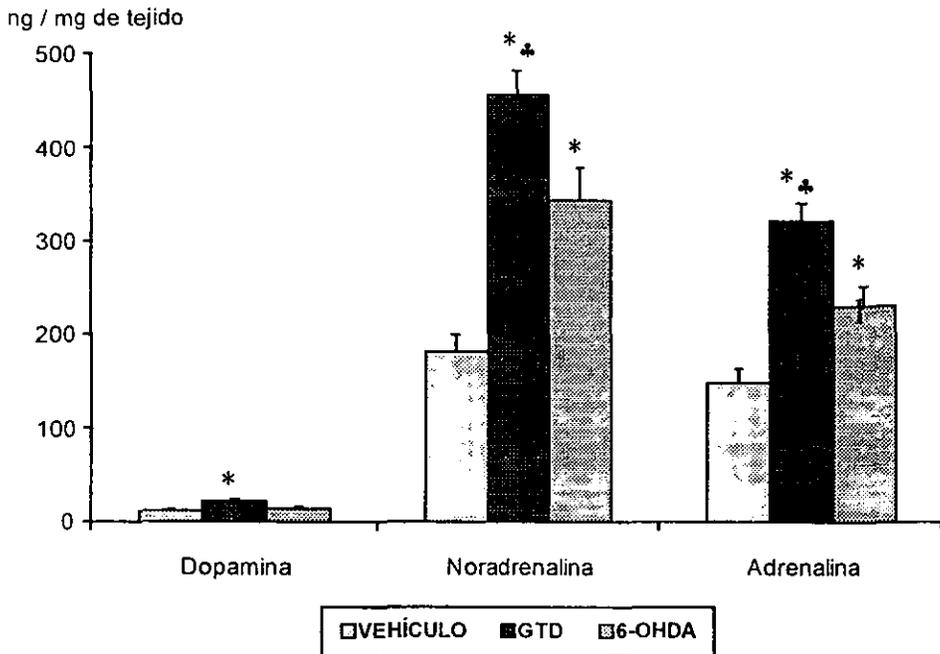
En la tabla 14 se observa que tanto la administración *in útero* de GTD como de 6-OHDA provocaron al nacimiento incremento en el contenido de todas las catecolaminas de la médula adrenal. En las hembras tratadas con GTD el contenido de DA se incrementó en un 166%, mientras que con 6-OHDA el incremento fue de 102%. El contenido de noradrenalina en los animales tratados con GTD o 6-OHDA el incremento fue alrededor del 200%. En los animales con administración de GTD el contenido de adrenalina fue de 190%, en tanto que en el grupo con 6-OHDA fue de 149%.

Tabla 14. Media \pm eem del contenido total (ng) de catecolaminas de la médula adrenal de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas al nacimiento.

Grupo	Dopamina	Noradrenalina	Adrenalina
VEHÍCULO	19.9 \pm 1.4	329.5 \pm 29.5	267.8 \pm 21.3
GTD	53.1 \pm 8.9 *	1104.9 \pm 69.5 *	776.8 \pm 43.2 *
6-OHDA	40.2 \pm 6.9 *	989.5 \pm 121.2 *	665.8 \pm 90.5 *

* P<0.05 vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

Cuando los resultados son presentados como concentración se observó que la denervación química realizada con GTD indujo en la médula adrenal, un incremento significativo en la concentración de todas las catecolaminas al nacimiento. La administración de 6-OHDA sólo provocó aumento en las concentraciones de noradrenalina y adrenalina (Gráfica 17).



* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

♣ $p < 0.05$ vs 6-OHDA (ANDEVA seguida por Tukey).

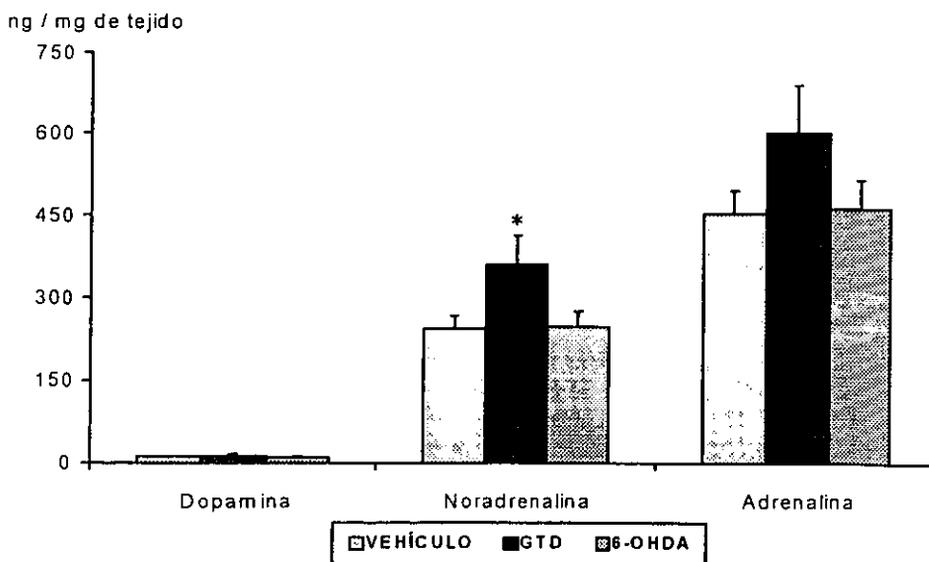
Gráfica 17. Media \pm eem de la concentración (ng/mg de tejido) de catecolaminas de la médula adrenal de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas al nacimiento.

A los 10 días de edad en la médula adrenal no se observaron cambios significativos en el contenido de las catecolaminas por efecto de la administración de GTD o 6-OHDA, durante la etapa fetal. Sólo el contenido de adrenalina del grupo con GTD es mayor con respecto al grupo con 6-OHDA. (Tabla 15). Sin embargo, al expresar los datos en función de la masa adrenal se observó que sólo en los animales tratados con GTD aún la concentración de noradrenalina permanece significativamente alta a los 10 días de edad, con respecto a la de los animales del grupo testigo. Las concentraciones de dopamina y adrenalina de ambos grupos con denervación, fueron semejantes a las del grupo con vehículo (Gráfica 18).

Tabla 15. Media \pm eem del contenido total (ng) de catecolaminas de la médula adrenal de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a los 10 días de edad.

Grupo	Dopamina	Noradrenalina	Adrenalina
VEHÍCULO	42.0 \pm 3.7	1020.6 \pm 69.6	1891.3 \pm 150.9
GTD	46.8 \pm 3.0	1320.1 \pm 116.6	2188.8 \pm 56.6 *
6-OHDA	39.4 \pm 3.1	1025.7 \pm 106.2	1877.1 \pm 106.9

* $P < 0.05$ vs 6-OHDA (ANDEVA seguida por Tukey).



* $p < 0.05$ vs Vehículo (ANDEVA seguida por Tukey).

Gráfica 18. Media \pm eem de la concentración (ng/mg de tejido) de catecolaminas de la médula adrenal de ratas tratadas durante la etapa fetal con vehículo, guanetidina (GTD) o 6-hidroxidopamina (6-OHDA) y sacrificadas a los 10 días de edad.

DISCUSIÓN

Los resultados derivados de este estudio nos permiten sugerir que desde la etapa fetal, la inervación catecolaminérgica modula de manera estimuladora los mecanismos neuroendócrinos que conllevan a la pubertad y en el folículo ovárico estimula su crecimiento y diferenciación.

Diversas investigaciones se han realizado para dilucidar el papel que tiene la inervación catecolaminérgica durante la preñez. Lawrence y Burden (1976) reportaron que en la rata la inervación catecolaminérgica de la glándula intersticial se incrementa conforme avanza la preñez. En la oveja se presenta un incremento en la concentración plasmática de catecolaminas unas horas antes del parto (Eliot y col., 1981). En esta misma especie, la administración de 6-hidroxidopamina provoca disminución en el contenido de noradrenalina, en las capas musculares del útero, lo cual se traduce en una reducción en la frecuencia de la actividad electromiográfica estimulada con estrógenos (Massmann y col., 1992). Experimentos realizados durante la preñez en diversas especies de mamíferos, incluyendo la rata, muestran una disminución en la constricción de las arterias y venas uterinas en respuesta a la noradrenalina (Hohmann y col., 1990; Matsumoto y Ducsay, 1992; McNutt y Ducsay, 1991; Weiner y col., 1991). Estas evidencias indican que es probable que las catecolaminas sean uno de los sistemas, pero no el único que participa en la modulación de las contracciones uterinas previas al parto.

En nuestro estudio la denervación simpática iniciada desde los 13 días de gestación con guanetidina o 6-hidroxidopamina no modificó la duración de la preñez. Sin embargo, es importante resaltar que las ratas denervadas invariablemente parieron un día después con respecto a las del grupo testigo. Cuando las ratas fueron tratadas con 6-hidroxidopamina dos hembras del grupo murieron sin llegar a parir (datos no presentados). Es posible que la administración de los fármacos, hayan afectado la inervación uterina de la madre y por

consecuencia la regulación de las contracciones uterinas. Ya Legrand y Maltier en 1986, habían reportado algo similar, donde en la rata preñada la administración de 6-hidroxidopamina induce que se prolongue el tiempo de gestación. La administración de guanetidina o 6-hidroxidopamina no modificó la proporción de crías nacidas vivas o muertas, lo cual apoya lo reportado por otros autores, quienes sugieren que la inervación catecolaminérgica no es fundamental para el desarrollo normal de la preñez (Evans y Burnstock, 1979; Roche y col., 1985; Lara y col., 1990a). En contraste a esto, se ha reportado que la administración de 6-OHDA durante la preñez en la rata (McDonald y Airaksinen, 1974) o en el ratón (Castrén y col., 1973) provoca incremento en el número de reabsorciones fetales y disminución en el número de crías nacidas vivas. En nuestro estudio no observamos este hecho, es probable que esta discrepancia se deba a que utilizamos una dosis menor a las reportadas en la literatura y al momento de la gestación en el que se inició el tratamiento. Estos datos nos permiten sugerir que la inervación catecolaminérgica no es esencial para la supervivencia de los fetos, sin embargo es posible que participe en la modulación de las contracciones uterinas previas al parto.

Existen datos en la literatura que muestran que en la rata preñada la 6-hidroxidopamina atraviesa la barrera placentaria, pero no encontramos referencias respecto a la guanetidina. Por esta razón se midió la concentración de catecolaminas en órganos que presentan una gran cantidad de fibras catecolaminérgicas, como son el bazo y el timo (órganos pertenecientes al sistema inmunológico). Además, se ha establecido una interacción bidireccional entre el sistema nervioso simpático y el sistema inmune. Las fibras nerviosas simpáticas inervan órganos linfoides, entre ellos el bazo y el timo, en asociación con linfocitos y macrófagos. Estas células inmunológicas poseen receptores a catecolaminas y neuropéptidos (Felten y Olschowka, 1987; Laposavic, 1992; Stevens-Felten y Bellinger, 1997).

En la rata neonata la simpatectomía química con 6-hidroxidopamina o la sección del nervio esplénico realizada en la etapa puberal, provocan disminución en la concentración de catecolaminas en el bazo acompañada de incremento en la respuesta inmune (Besedovsky y col., 1979, 1981 y 1985). La simpatectomía química seguida de la adrenalectomía aumenta aún más esta respuesta (Besedovsky y col., 1979). Este mismo efecto se presenta en el ratón donde la administración de 6-hidroxidopamina durante los primeros días de vida provoca disminución en el contenido de catecolaminas del bazo y timo acompañada de un incremento en la respuesta inmune, efectos que se amplifican cuando, además del neurotóxico, se administra la alfa-metil-para- tirosina (α -MPT) un inhibidor de la tirosina hidroxilasa (Besedovsky y col., 1983; Cross y col., 1987; Williams y col., 1981). Estas evidencias han permitido sugerir que el sistema nervioso simpático modula de manera inhibitoria al sistema inmune, principalmente por vía de las catecolaminas.

Nuestros resultados muestran que tanto la guanetidina como la 6-hidroxidopamina atraviesan la barrera placentaria. El tratamiento con estos fármacos producen efectos diferentes; en tanto que la guanetidina o 6-hidroxidopamina tiene un efecto diferencial, la guanetidina afectó principalmente a las neuronas noradrenérgicas (en el bazo no se detectó noradrenalina), la 6-hidroxidopamina modificó a las dopaminérgicas, ya que la concentración de dopamina en el timo estuvo por debajo de la sensibilidad del método y mas aún, la concentración de esta catecolamina se depletó en el hipotálamo. En apoyo a esto, se ha mostrado que la simpatectomía farmacológica, realizada con guanetidina, provoca en el bazo disminución de la concentración de catecolaminas (Favre-Maurice y col., 1992; Jaim-Etcheverry y Zieher 1971), siendo más sensibles las neuronas noradrenérgicas que las dopaminérgicas (Favre-Maurice y col., 1992).

En el animal adulto la guanetidina o la 6-hidroxi-dopamina no atraviesa la barrera hematoencefálica (Angeletti y col., 1972; Kostrzewa y Jacobowitz, 1974; Maxwell, 1982). Pero en el feto de rata y en el animal antes del día 6 de vida dicha barrera aún es inmadura (Johnson Jr y col., 1976; Saunders, 1977; Xu y Ling, 1994). En apoyo a la aseveración anterior, se sabe que durante la preñez la administración de 6-hidroxi-dopamina en la rata o ratón, provoca en los fetos disminución en la concentración de noradrenalina hipotalámica y a nivel periférico (Castrén y col., 1973; McDonald y Airaksinen, 1974). En la rata los sistemas noradrenérgico y dopaminérgico hipotalámicos, son funcionales desde el día 15 de desarrollo fetal y es posible medir sus neurotransmisores ya desde esta edad (Borisova y col., 1991; Coyle y Henry, 1973). Por lo tanto, si la guanetidina o la 6-hidroxi-dopamina atravesaron la barrera hematoencefálica, estos sistemas de neurotransmisión catecolaminérgicos pudieron ser susceptibles a los efectos de estos fármacos.

Nuestros resultados muestran que la administración de 6-hidroxi-dopamina, pero no de guanetidina, indujo en los animales recién nacidos disminución en las concentraciones de dopamina hipotalámica. Por lo anterior, podemos señalar que el tratamiento con 6-hidroxi-dopamina indujo una denervación dopaminérgica a nivel del sistema nervioso central. El hecho de que estos animales a los 10 días de edad presentaran una recuperación en la concentración de dopamina hipotalámica, podría deberse a que algunas neuronas dopaminérgicas remanentes, hayan tenido una hiperactividad para compensar la falta de las neuronas dañadas, como lo mostraron Fernandes Xavier y col. (1994). Estos autores encontraron en la rata de 15 días de vida un incremento de la inervación dopaminérgica de la sustancia nigra, a la cual previamente se le administró 6-hidroxi-dopamina de manera intraventricular a los 3 días de vida.

El incremento en la actividad de las neuronas monoaminérgicas hipotalámicas que presentaron los animales simpatectomizados con guanetidina o 6-hidroxidopamina durante la etapa peripuberal, podría deberse a un reajuste de estos sistemas en respuesta a la denervación. Dado que no fue posible separar y cuantificar la noradrenalina hipotalámica en los animales recién nacidos no podemos descartar que la guanetidina o la 6-hidroxidopamina hayan afectado a las neuronas noradrenérgicas.

El peso corporal no se modificó en los animales denervados con guanetidina en ninguna de las edades evaluadas. Numerosos estudios reportan que en la rata denervada con guanetidina en diferentes etapas de la vida, disminución en el peso corporal (Benarroch y col., 1990; Flores y col., 1990; Lara y col., 1990a; Zochodne y col., 1990). A diferencia de lo observado por la denervación con guanetidina, la administración de 6-hidroxidopamina incrementó el peso corporal desde el nacimiento hasta los 10 días de edad y nuevamente al primer estro vaginal. Probablemente el incremento en la masa corporal este relacionado con la hormona del crecimiento, ya que se ha reportado que la administración de 6-hidroxidopamina modifica la secreción de esta hormona (Willoughby y Day, 1981). Al momento no contamos con una explicación para el incremento en el peso corporal que se registró en los animales al primer estro vaginal.

En la rata, la administración de guanetidina desde los primeros días de vida induce retraso en la edad de apertura vaginal (Albuquerque-Araujo y col., 1990; Flores y col., 1990; Lara y col., 1990a). Nuestros resultados apoyan los estudios anteriores. Es probable que en nuestros animales la sensibilidad de la vagina a los estrógenos haya disminuido ya que la concentración sérica de estradiol no se modificó en ninguna de las edades evaluadas. La disminución en la sensibilidad de la vagina podría estar relacionada con una disminución en la expresión de los receptores β -adrenérgicos, ya que en el tracto reproductivo la expresión de estos receptores es estimulada por los estrógenos y la progesterona

(Brauer y Burnstock, 1998; Paton y col., 1978). Por lo tanto, la caída en la concentración de progesterona, la posible eliminación de la inervación noradrenérgica de la vagina, o ambas podrían haber causado disminución en el número de receptores β -adrenérgicos.

En el grupo tratado con guanetidina, la disminución en las concentraciones séricas de progesterona a los 30 días y al primer estro vaginal, nos permite plantear la posibilidad de que, la señal ovárica por medio de la secreción de progesterona, fue insuficiente para estimular la secreción de GnRH hipotalámica. Tanto en la rata prepúber como en la adulta, la progesterona tiene un papel estimulador sobre la secreción de la GnRH (Brann y Mahesh, 1991; Kim y Ramírez, 1982) efecto mediado por las neuronas noradrenérgicas (Brann y Mahesh, 1991). Esto nos permite sugerir que la disminución en la concentración de progesterona provocaría una atenuación en el pico preovulatorio de la LH, por lo que se necesitaría un mayor tiempo de exposición a la progesterona para desencadenar los mecanismos neuroendócrinos implicados en el inicio de la pubertad. El hecho de que en los animales denervados con 6-hidroxidopamina no presentaron retraso en la edad de apertura vaginal y que las concentraciones séricas de progesterona no se hayan modificado apoyarían esta sugerencia. En la cobaya la denervación realizada con guanetidina, desde el nacimiento o a partir del día 10 de vida, adelantó el inicio de la pubertad e incrementó las concentraciones séricas de progesterona medidas durante la fase folicular (Riboni y col., 1998).

A diferencia de lo anterior, también fue reportado que la eliminación de la inervación catecolaminérgica, inducida por la administración de guanetidina, a ratas hembras de 21 días de edad no modifica la edad de apertura vaginal, mientras que el bloqueo del sistema colinérgico, a través de receptores muscarínicos, sí lo hace (Trkulja y Lackovic, 1996).

Con base a todo lo anterior, parece ser que el inicio de la pubertad se requiere no sólo de las hormonas hipotalámicas-hipofisarias, si no también de la integridad de la inervación catecolaminérgica desde la etapa fetal y hasta la etapa infantil.

La administración de 6-hidroxidopamina durante la etapa fetal provocó en los animales de 10 días de edad incremento en las concentraciones séricas de estradiol, el cual pudo ser de origen ovárico, ya que se sabe que a nivel central la neurona dopaminérgica ejerce una regulación inhibitoria sobre la neurona GnRHérgica, por lo que la eliminación de este tipo de regulación, provocaría incremento en la liberación de la GnRH y por tanto en la secreción de gonadotropinas (Gallo, 1981) las que a su vez, estimularían en el ovario la síntesis de estrógenos.

En la literatura existen reportes contradictorios acerca del efecto de la denervación inducida con guanetidina sobre las concentraciones de estradiol en la rata prepúber. Alburquerque-Araujo y col. (1995) reportan una disminución en la concentración plasmática de estradiol a los 30 días de edad, la cual desaparece cuando los animales alcanzan el primer estro vaginal. Sin embargo, cuando estos ovarios se cultivan en presencia o ausencia de gonadotropinas, la concentración de estradiol siempre es menor, respecto al grupo control. Otros estudios *in vitro* mostraron que la concentración basal de estradiol no se modificó en los animales denervados (Lara y col., 1990a; Rosa-E-Silva y col., 1997) pero la respuesta es menor ante el estímulo con hCG (Lara y col., 1990a). Como en nuestro estudio la concentración sérica de estradiol no se modificó en los animales tratados con guanetidina. Podemos sugerir de que la eliminación de la inervación catecolaminérgica, inducida con guanetidina desde la etapa fetal, no modifica la secreción de estradiol.

A principios de la década pasada, se mostró que en la rata prepúber la estimulación de los receptores β -adrenérgicos de las células de la granulosa incrementa la producción de progesterona tanto *in vivo* como *in vitro* (Adashi y Hsueh, 1981; Aguado y col., 1982; Ratner y col., 1980). Lara y col., (1990a) utilizando el modelo de la rata prepúber denervada con guanetidina mostraron que la administración de este fármaco provoca disminución en el número de receptores β -adrenérgicos en las células de la granulosa, acompañado de una menor respuesta esteroidogénica. Estudios inmunocitoquímicos revelaron que en el ovario de los animales denervados con guanetidina, no se modificó la intensidad de la reacción a la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD, enzima que convierte a la pregnenolona en progesterona). Dado que también se ha mostrado una disminución en la concentración ovárica de pregnenolona, es posible que la inervación catecolaminérgica module de manera estimuladora la producción de progesterona desde la producción de su precursor (Rosa-E-Silva y col., 1997). En nuestro trabajo, los animales tratados con guanetidina presentaron disminución en la secreción sérica de progesterona. Esto concuerda con lo reportado por otros investigadores donde en la rata prepúber la administración de guanetidina provoca disminución en la concentración basal de progesterona ovárica (Rosa-E-Silva y col., 1997) y en la estimulada con gonadotropinas (Lara y col., 1990a). La disminución en la concentración sérica de progesterona podría ser explicada por una disminución en la concentración de los receptores β -adrenérgicos de las células de la granulosa, tal y como ha sido sugerido (Lara y col., 1990a) Estos resultados nos permiten sugerir que la inervación noradrenérgica modula de manera estimuladora la respuesta esteroidogénica del ovario, principalmente estimulando la producción de progesterona.

Los receptores β -adrenérgicos tienen un papel estimulador en la síntesis de andrógenos ováricos. Estudios *in vitro*, utilizando células tecointersticiales del ovario de ratas prepúberes, han mostrado que la estimulación de receptores β -adrenérgicos induce incremento en la producción de andrógenos (Dyer

y Erickson, 1985; Hernández y col., 1988). En la rata neonata la eliminación de la innervación catecolaminérgica por la administración de guanetidina no modifica el número de receptores β -adrenérgicos en las células de la teca y glándula intersticial "ovario residual" (Lara y col., 1990a). En nuestro trabajo la disminución en la concentración de testosterona sérica a los 10 y 20 días de edad en los animales denervados podría deberse a un cambio en la población de receptores β -adrenérgicos a nivel de las células de la teca. Estos datos nos permite apoyar el hecho de que la innervación catecolaminérgica participa de manera estimuladora, durante la etapa infantil, en la producción de andrógenos.

Los resultados de nuestra investigación apoyan el trabajo realizado por Ben-Jonathan y col., (1984) donde muestran que en la rata prepúber el contenido de noradrenalina ovárica se incrementa conforme avanza la edad de los animales, presentando una depleción a los 20 días. Esta caída en el contenido de catecolaminas también fue observada en nuestro estudio, independientemente del grupo experimental. La simpatectomía realizada con guanetidina o 6-hidroxidopamina no depletó las concentraciones de catecolaminas ováricas. Esto podría deberse a:

1) Un aporte de catecolaminas provenientes de la médula suprarrenal. En el ovario, las catecolaminas no sólo son provistas por la vía neural, sino que también recibe el aporte proveniente de las adrenales que le llega por vía sanguínea. Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que al nacimiento, tanto en los animales denervados con guanetidina como con 6-hidroxidopamina se presentó un incremento en el contenido de todas las catecolaminas de la médula suprarrenal de al menos 250 %. Este dato es similar al reportado en la literatura (Johnson Jr y col., 1976; Kostrzewa y Jacobowitz, 1974). Estos autores mostraron que la simpatectomía provoca un incremento transitorio en la actividad de la tirosina hidroxilasa de las adrenales (240 %, con respecto al grupo control) que se traduce en un incremento en el contenido de catecolaminas. En la rata macho adulto se

presenta este aumento 16 horas después de la administración del neurotóxico (Mueller y col., 1969). El incremento en la síntesis de catecolaminas adrenales es una respuesta compensatoria de la glándula a la disminución de la función del sistema nervioso simpático periférico. Esta mediada por una mayor actividad de nervios colinérgicos preganglionares, ya que en animales previamente simpatectomizados, la sección de los nervios que llegan a la glándula suprarrenal suprime el incremento en la síntesis de catecolaminas (Mueller y col., 1969; Thoenen y col., 1969). Otros grupos de investigadores utilizando estos mismos fármacos no encontraron diferencias significativas en el contenido de catecolaminas de origen adrenal (Lara y col., 1990a; Lo y col., 1991). Al parecer la capacidad de respuesta de la médula suprarrenal a la simpatectomía química depende de la dosis utilizada, de la edad del animal en que se inicia el tratamiento y del tiempo en que se evalúa esta respuesta. Existen evidencias que resaltan la participación de las suprarrenales en los eventos reproductivos, conjuntamente con el eje hipotálamo-hipófisis-gónada. Por ejemplo, se sabe que en la rata hembra infantil la remoción conjunta de los ovarios y de las adrenales incrementa la respuesta de la hipófisis a la GnRH (Ojeda y col., 1977). A principios de la década de los 80's el grupo de Aguado, mostró que en la rata prepúber la medulectomía provoca retraso en el inicio de la pubertad (Aguado y Ojeda, 1984b).

2) Síntesis de catecolaminas *de novo* por el propio ovario. Este órgano tiene la capacidad de producir catecolaminas *per se* (Ben-Jonathan y col., 1984; Wrutniak-Zolnowska, 1980). Para poder probar esta posibilidad, es necesario realizar un estudio de la actividad de las células cromafines ováricas de animales simpatectomizados.

3) Reinervación de fibras catecolaminérgicas en el ovario. No podemos descartar la posibilidad de que se haya producido una reinervación de fibras catecolaminérgicas en el ovario de animales con simpatectomía química, ya que hay evidencias de reinervación tanto a nivel de sistema nervioso central como periférico.

El tiempo de inicio de este proceso depende del órgano y de la edad en la cual se realiza la denervación . (Bennett y col., 1982; Evans y col., 1979; Fernandes Xavier y col., 1994; Lorton y col., 1990). Para poder confirmar o descartar esta posibilidad sería necesario realizar un estudio de histofluorescencia donde se demuestre la presencia o ausencia de fibras catecolaminérgicas ováricas, en los animales denervados.

Existe cierta controversia en cuanto a la participación de la inervación catecolaminérgica en la regulación del proceso de ovulación. En la rata prepúber o adulta la sección unilateral del nervio ovárico superior, provoca disminución en el número de ovocitos liberados en el ovario denervado. Los autores han planteado que la inervación simpática a nivel folicular modula de manera estimuladora la acción de las gonadotropinas (Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993 y 1998). Sin embargo, se ha sugerido que en la rata prepúber, la inervación catecolaminérgica modula de manera inhibitoria la reactividad del folículo a las gonadotropinas, mientras que en rata adulta esta modulación es estimuladora (Ayala y Domínguez, 1988; Flores y col., 1990). Recientemente se reportó que en la rata vieja (mayor de 12 meses) esta inervación tiene nuevamente un papel inhibitorio (Vázquez, 1997). La discrepancia en los resultados entre una denervación quirúrgica y una química sobre la respuesta del folículo a las gonadotropinas, radica posiblemente en que en el modelo del animal denervado quirúrgicamente se seccionan todas las fibras que viajan por el nervio ovárico superior tanto catecolaminérgicas como peptidérgicas, mientras que en el animal denervado químicamente la destrucción se extiende a otros órganos periféricos que también reciben inervación simpática. En este trabajo, no se modificó el número total de ovocitos liberados en los animales denervados con guanetidina o 6-hidroxidopamina. Por tanto, la respuesta a la denervación depende de la edad, del fármaco utilizado así como del tiempo transcurrido después de la denervación. En nuestro estudio este plazo es de al menos 6 semanas, tiempo en el cual no podemos descartar que se haya presentado una reinervación o algún

otro mecanismo compensador, mientras que en los trabajos ya mencionados se evalúa en un lapso postratamiento de mucho menos duración.

Se ha planteado que la acción inhibitoria de la inervación simpática en la respuesta del folículo a las gonadotropinas se presente sobre todo en los folículos preovulatorios (Ayala y Domínguez, 1988; Flores y col., 1990). Los resultados de Bódís y col. (1993 a,b) y Papenfuss y col. (1993) ha mostrado con estudios *in vitro* que de folículos preovulatorios de la mujer que la estimulación con LH o FSH incrementan significativamente la secreción de estradiol y progesterona. Este mismo estímulo en presencia de noradrenalina atenúa el efecto amplificador de las gonadotropinas. Es bien sabido que existe una relación inversa entre el contenido de catecolaminas ováricas y las concentraciones plasmáticas de gonadotropinas. Así, en la rata prepúber se produce una caída en la concentración de noradrenalina ovárica en respuesta al pico preovulatorio de FSH que antecede a la canalización de la vagina. De igual manera, la estimulación con PMSG induce una disminución en la concentración de noradrenalina 12 hrs. después de su administración (Bahr y Ben-Jonathan, 1981; Ben-Jonathan y col., 1982).

En el ovario de la rata se ha observado, por estudios de inmunohistoquímica, la presencia de fibras catecolaminérgicas desde la etapa prenatal y en las primeras horas de vida. Estas fibras se encuentran asociadas a vasos sanguíneos y a células ováricas primordiales al momento de la foliculogénesis (Malamed y col., 1992). En el ovario de la rata adulta esta inervación se encuentra en relación estrecha con células epiteliales de folículos primordiales y en relación con la teca de folículos en diferentes estados de desarrollo (Burden, 1972, 1985; Stefenson y col., 1981). Recientemente Mayerhofer y col., (1997) utilizando cultivos de ovarios de rata de 2 días de edad, mostraron que la estimulación de los receptores β -adrenérgicos o la adición al medio de VIP, incrementa el RNAm del receptor a FSH y del complejo enzimático P-450 aromatasas mediante la formación de AMP cíclico. Estas evidencias sugieren que la información neural modula el

crecimiento folicular desde etapas tempranas, ya que en los primeros tres días de vida el ovario carece de receptores a gonadotropinas.

En nuestro trabajo, la administración de GTD sólo indujo incremento en el número de folículos totales a los 10 días de edad, mientras que, en las siguientes edades no se modificó. Esto contrasta con lo reportado por Lara y col. (1990a) quienes al efectuar la simpatectomía en la etapa neonatal encontraron a los 30 días de edad disminución en el número total de folículos. Esta discrepancia tal vez radique en las diferentes dosis del fármaco utilizadas y en el momento de su administración. La denervación catecolaminérgica realizada con guanetidina, tanto en la rata adulta como en la prepúber induce retraso en el crecimiento folicular (Ayala y Domínguez, 1988; Lara y col., 1990a). Estudios histológicos del ovario denervado en la rata prepúber muestran una disminución del volumen folicular, del área de las células de la granulosa y del volumen de las células teco-intersticiales (Rosa e Silva y col., 1997). En nuestro estudio, los animales denervados con guanetidina o 6-hidroxi-dopamina se encuentra a los 30 días de edad un retraso en el crecimiento folicular en los folículos que se encuentran entre 70 y 350 μm de diámetro. Estos datos nos permiten sugerir que la inervación catecolaminérgica participa de manera estimuladora en el crecimiento y desarrollo de los folículos que entran al crecimiento y que pueden llegar a ser ovulados en el momento en que se presente el pico preovulatorio de las gonadotropinas.

La respuesta del folículo a la denervación con guanetidina o 6-hidroxi-dopamina fue diferente. La administración de guanetidina indujo incremento de la atresia, mientras que la 6-hidroxi-dopamina, dependiendo de la edad evaluada, provoca disminución o incremento en el número de folículos sanos. Es muy probable que esta diferencia se deba a que la guanetidina afectó principalmente a las neuronas noradrenérgicas, en tanto que la 6-hidroxi-dopamina a neuronas dopaminérgicas. En apoyo a lo anterior, en los animales de 30 días de edad tratados con 6-hidroxi-dopamina no se detectó dopamina ovárica y coincidió con un

retraso en el crecimiento folicular y una disminución en el número de folículos sanos. En cambio, la denervación con guanetidina durante la etapa fetal provocó en los animales de 10 días de edad, incremento en el número de folículos totales que corresponde a los folículos atrésicos menores de 70 μm de diámetro. El alto índice de atresia en estos folículos no está relacionado con la falta de catecolaminas, dado que éstas no se modificaron. Este hecho podría explicarse por una disminución en el número de receptores β -adrenérgicos, que traería como consecuencia disminución en el número de receptores a la FSH y con ello un menor crecimiento del folículo primordial (Mayerhofer y col., 1997). Además se sabe que la FSH es una de las principales señales hormonales, que estimula el desarrollo y crecimiento folicular y ejerce un papel diferenciador sobre las células de la granulosa y tiene la propiedad de ser un agente antiatrésico (Hirshfield, 1986; McGee y col., 1997). Por tanto el mecanismo de transducción intracelular, estimulado por las catecolaminas, sería insuficiente para mantener la respuesta a la FSH y garantizar el crecimiento y la viabilidad de los folículos primordiales. Por lo tanto, en el modelo del animal denervado se disminuye la sensibilidad del folículo a las gonadotropinas.

Los resultados de este estudio, en conjunto con las evidencias bibliográficas nos permiten postular que la inervación simpática, vía NA y VIP, estimula en los folículos más pequeños la aparición de receptores a gonadotropinas, mientras que en los folículos en crecimiento estaría estimulando la síntesis de hormonas esteroides (Figura 7).

Finalmente en este trabajo observamos que los efectos causados por la administración de guanetidina o 6-hidroxiopamina son diferentes. Estas diferencias se deben entre otros factores se debe a la dosis de 6-hidroxiopamina utilizada. Krukoff y col. (1990), mostraron en la rata que cuando se administra guanetidina o 6-hidroxiopamina desde los primeros días de vida, el grado de denervación periférica es mayor con guanetidina que con 6-hidroxiopamina. También se ha mostrado en algunos órganos que en respuesta a la simpatectomía periférica inducida con

guanetidina se presenta un número mayor de fibras sensoriales, reactivas a CGRP y Sustancia P (Aberdeen y col., 1990; Mione y col., 1992). A partir de nuestros resultados podemos sugerir que la simpatectomía realizada con 6-hidroxidopamina no es semejante a la inducida con guanetidina, ya que la primera afecta principalmente a las neuronas dopaminérgicas, mientras que la segunda afecta a las noradrenérgicas.

Con los resultados de este trabajo mostramos que ya desde la etapa fetal la inervación catecolaminérgica periférica modula conjuntamente con el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, procesos reproductivos como son el crecimiento y diferenciación folicular, la pubertad y la ovulación. Aunado a este control se encuentra la participación de las suprarrenales.

Figura 7. Modelo propuesto para explicar la participación de la inervación noradrenérgica sobre las funciones del ovario de la rata prepúber. La inervación catecolaminérgica proveniente del nervio ovárico superior y del plexo ovárico se asocia con los folículos en diferentes etapas del desarrollo y con la glándula intersticial. En los folículos mas pequeños la noradrenalina junto con el VIP, estimulan la aparición de los receptores a la FSH y así iniciar su crecimiento. En la teca la noradrenalina participa en la producción de andrógenos, mientras que en las células de la granulosa en la producción de progesterona. Esta progesterona estimularía en el hipotálamo la secreción de GnRH. Es posible que la participación de la inervación catecolaminérgica sea modulada por la inervación sensorial del ovario, la cual llegaría principalmente a los vasos sanguíneos.

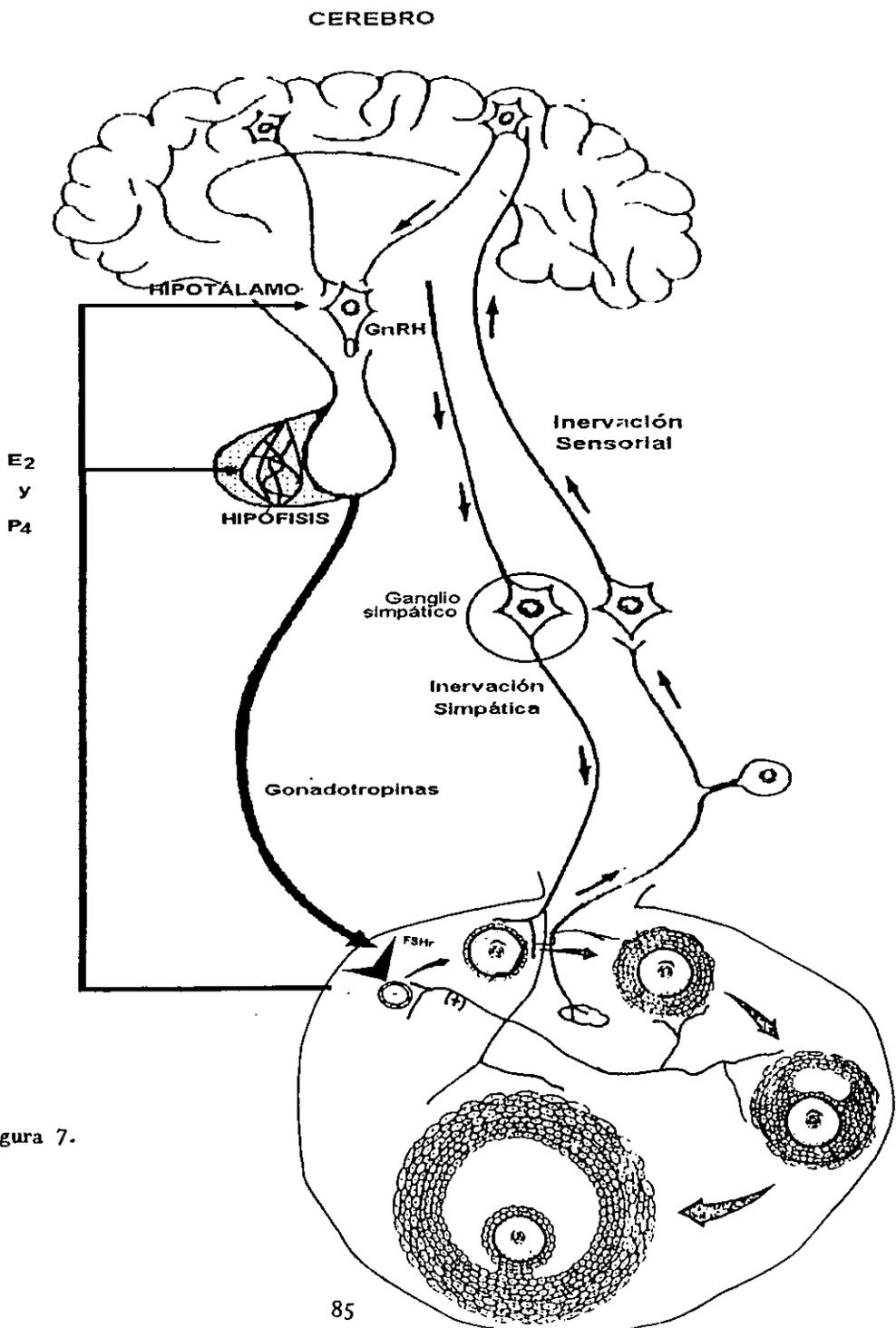


Figura 7.

CONCLUSIONES

La innervación catecolaminérgica en la rata preñada no parece ser esencial en el mantenimiento de la preñez y en el desarrollo de los fetos.

La innervación noradrenérgica es más susceptible a la acción de la guanetidina mientras que la dopaminérgica lo es para la 6-hidroxidopamina.

Desde la etapa fetal la innervación noradrenérgica tiene un papel estimulador en los procesos neuroendócrinos que culminan con la pubertad.

En la rata prepúber la información noradrenérgica que llega al ovario por vía neural estimula la esteroidogénesis, principalmente la producción de progesterona.

Las fibras catecolaminérgicas ováricas modulan de manera estimuladora el crecimiento folicular, sobre todo el de los folículos menores de 350 μm de diámetro. Además estimulan la diferenciación de los folículos primordiales, probablemente estimulando la expresión de receptores a la FSH.

Las adrenales tienen la capacidad de incrementar la producción de catecolaminas en respuesta a la simpatectomía química desde la etapa fetal.

PERSPECTIVAS

Con base a los resultados obtenidos del presente estudio surgen una serie de interrogantes a contestar:

¿Cuándo se realiza la denervación simpática en la última etapa del desarrollo fetal, se produce en el ovario reinervación. De ser así, en que etapa del desarrollo se presenta ?

¿La disminución en la producción de progesterona y testosterona esta relacionada con una disminución en el número de receptores β -adrenérgicos del ovario denervado?

¿En el animal simpatectomizado el retraso en el inicio de la pubertad esta relacionado con la disminución en la secreción de progesterona?

¿Cómo participa la inervación catecolaminérgica de la vagina en la respuesta de ésta a los estrógenos?

¿ En los folículos más pequeños la inervación simpática estimula la aparición de receptores a gonadotropinas, principalmente a la FSH?

¿La inervación catecolaminérgica modula la acción de los factores neurotróficos?

¿Al eliminarse la inervación catecolaminérgica, algún otro sistema de neurotransmisión que recibe el ovario toma el control en la regulación del crecimiento y diferenciación folicular? ¿Existe un relevo en el papel de la inervación simpática y la sensorial a la falta de una?

BIBLIOGRAFIA

- ABERDEEN, J., CORR, L., MILNER, P., LINCOLN, J. y 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.
- ACKERMAN, K.D., FELTEN, S.Y., BELLINGER, D.L. y FELTEN, D.L. (1987). Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: III. Development of innervation in the rat spleen. *Journal of Neuroscience Research*, **18**: 49-54.
- ADASHI, E.Y. y HSUEH, A.J. (1981). Stimulation of β -adrenergic responsiveness by follicle-stimulating hormone in rat granulosa cells *in vitro* and *in vivo*. *Endocrinology*, **108**: 2170-2178.
- AGUADO, L.I. y OJEDA, S.R. (1984a). Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology*, **114**: 1944-1946.
- AGUADO, L.I. y OJEDA, S.R. (1984b). Effect of selective removal of the adrenal medulla on female sexual development. *Biology of Reproduction*, **31**: 605-618.
- AGUADO, L.I. y OJEDA, S.R. (1986). Prepubertal rat ovary: hormonal modulation of β -adrenergic receptors and of progesterone response to adrenergic stimulation. *Biology of Reproduction*, **34**: 45-50.
- AGUADO, L.I., PETROVIC, S.L. y OJEDA, S.R. (1982). Ovarian β -adrenergic receptors during the onset of puberty: characterization, distribution, and coupling to steroidogenic responses. *Endocrinology*, **110**: 1124-1132.
- AHMED, C.E., DEES, W.L. y OJEDA, S.R. (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP) containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*, **118**: 1682-1689.
- ALBUQUERQUE-ARAUJO, W.I.C., ROSA-E-SILVA, A.A.M., ANTUNES-RODRIGUES, J. y FAVARETTO, A.L.V. (1995). Is ovarian adrenergic innervation essential to gonadal function in adult rats. *Archives of Physiology and Biochemistry*, **103**: 109-113.
- ALBUQUERQUE-ARAUJO, W.I.C., ROSA-E-SILVA, A.A.M., FRANCI, J.A.A., FAVARETTO, A.L.V. y ANTUNES-RODRIGUES, J. (1990). The effect of guanethidine-induced denervation of the peripheral sympathetic nervous system on the onset of puberty in female rats. *Brazilian Journal Medical Biology Research*, **23**: 1181-1184.

ANDREWS,W.W. y OJEDA,S.R. (1981). A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty. *Endocrinology*, **98**: 241-249.

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

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

BAHR,J. y BEN-JONATHAN,N. (1981). Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology*, **108**: 1815-1820.

BAHR,J., KAO,L. y NALBANDOV,A.V. (1974). The role of catecholamines and nerves in ovulation. *Biology of Reproduction*, **10**: 272.

BALJET,B. y DRUKKER,J. (1980). The extrinsic innervation of the pelvic organs in the female rat. *Acta anatomical*, **107**: 241-267.

BELLINGER,D.L., FELTEN,S.Y., COLLIER,T.J. y FELTEN,D.L. (1987). Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: IV. Morphometric analysis in adult and aged F344 rats. *Journal of Neuroscience Research*, **18**: 55-63.

BENARROCH,E., SCHMELZER,J., WARD,K., NELSON,D. y LOW,P. (1990). Noradrenergic and neuropeptide Y mechanisms in guanethidine sympathectomized rats. *American Journal Physiology*, **259**: 371-375.

BEN-JONATHAN,N., ARBOGAST,L.A., RHOADES,T.A. y BAHR,J.M. (1984). Norepinephrine in the rat ovary : Ontogeny and the novo synthesis. *Endocrinology*, **110**: 457-461.

BEN-JONATHAN,N., BRAW,R.H., LAUFER,N., REICH,R., BAHR,J.M. y TSAFRIRI,A. (1982). Norepinephrine in graafian follicles is depleted by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, **115**: 1426-1431.

BENNETT,T., GARDINER,S.M. y KEMP,P.A. (1982). An assesment of the effectiveness of neonatal treatment with guanethidine as a means of producing sympathectomy. *Brain Journal of Pharmacology*, **76**: 557- 564.

BESEDOVSKY,H.O., DA PRADA,M., DEL REY,A. y SORKIN,E. (1981). Immunoregulation by sympathetic nervous system. *Trends Pharmacology Sciences*, **2**: 236-238.

BESEDOVSKY,H.O., DEL REY,A., SORKIN,E., DA PRADA,M., BURRI,R., HONEGGER,C. (1983). The immune response evokes changes in brain noradrenergic neurons. *Science*, **221**: 564-565.

BESEDOVSKY,H.O., DEL REY,A. y SORKIN,E.(1985). Immune-neuroendocrine interactions. *Journal of Immunology*, **135**: 750s-754s.

BESEDOVSKY,H.O., DEL REY,A., SORKIN,E., DA PRADA,M. y KELLER,H.H. (1979). Immunoregulation mediated by the sympathetic nervous system. *Cellular Immunology*, **48**: 346-355.

BLEIER,R., COHN,P. y SIGGELKOW,R. (1979). A cytoarchitecture atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat. En: **Anatomy of the Hypothalamus**. P. Morgane y J. Panksepp Eds., Vol. I, Marcel Dekker Inc., New York, 137- 220.

BODIS,J., HARTMANN,G., TÖRÖK,A., BOGNÁR,Z., TINNEBERG,H.-R., CLEDON,P. y HANF,V. (1993a). Relation between the monoamine and gonadotropin content in follicular fluid of preovulatory graafian follicles after superovulation treatment. *Experimental and Clinical Endocrinology*, **101**: 178-182.

BODIS,J., TINNEBERG,H.-R., TÖRÖK,A., CLEDON,P., HANF,V., y PAPPENFUSS,F. (1993b). Effect of noradrenaline and dopamine on progesterone and estradiol secretion of human granulosa cells. *Acta Endocrinologica*, **129**: 165-168.

BORISOVA,N.A., SAPRONOVA,A.Y., PROSHLYAKOVA,E.V. y UGRUMOV,M.V. (1991). Ontogenesis of the hypothalamic catecholaminergic system in rats: synthesis, uptake and release of catecholamines. *Neuroscience*, **43**: 223-229.

BOULLIN,D.J., COSTA,E. y BRODIE,B.B. (1966). Discharge of tritium-labeled guanethidine by sympathetic nerve stimulation as evidence that guanethidine is a false transmitter. *Life Sciences*, **5**: 803-808.

BRANN, D.W. y MAHESH,V.B. (1991). Detailed examination of the mechanism and site of action of progesterone and corticosteroids in the regulation of gonadotropin secretion: hypothalamic gonadotropin-releasing hormone and catecholamine involvement. *Biology of Reproduction*, **44**: 1005-1015.

BRAUER,M. y BURNSTOCK,G. (1998). Expression of β -adrenergic receptors in the rat uterus: effects of puberty and oestrogen treatment during prepubertal development. *Int. J. Devl. Neuroscience*, **16**: 29-39.

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

BRINK,C.C. y GROB,H.S. (1973). Response of the denervated mouse ovary to exogenous gonadotropins. *Biology of Reproduction*, **9**: 108.

BUONAMICI,M., CERVINI,M.A., ROSSI,A.C., SEBASTIANI,L., RAFFAELLI,A., y BAGNOLI,P.(1990). Injections of 6-hydroxydopamine in the substantia nigra of the rat brain: morphological and biochemical effects. *Behavioural Brain Research*, **38**: 83-95.

BURDEN,H.W. (1972). Adrenergic innervation in ovaries of the rat and guinea pig. *American Journal of Anatomy*, **133**: 455-462.

BURDEN,H.W. (1978). Ovarian innervation. En: *The Vertebrate Ovary*. Jones,R. Ed. Plenum Press, New York: pp. 615-638.

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

BURNSTOCK,G., EVANS,B., GANNON,B.J., HEATH,J.W. y JAMES,V. (1971). A new method of destroying adrenergic nerves in adult animals using guanethidine. *British Journal of Pharmacology*, **43**: 295-301.

CALKA,J., McDONALD,J.K. y OJEDA,S.R. (1988). The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biology of Reproduction*, **39**: 1215-1223.

CASTRÉN,O., AIRAKSINEN,M.M. y SAARIKOSKI,S. (1973). Decrease of litter size and fetal monoamines by 6-hydroxydopamine in mice. *Experientia*, **29** (5): 576-578.

CONLEY,A.J. y BIRD,I.M. (1997). The role of cytochrome P450 17 α -hydroxylase and 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase in the integration of gonadal and adrenal steroidogenesis via the Δ 5 and Δ 4 pathways of steroidogenesis in mammals. *Biology of Reproduction*, **56**: 789-799.

COYLE,J.T. y HENRY,D. (1973). Catecholamines in fetal and newborn rat brain. *Journal of Neurochemistry*, **21**: 61-67.

CROSS,R.J., BROOKS,W.H. y ROSZMAN,T.L. (1987). Modulation of T-suppressor cell activity by central nervous system catecholamine depletion. *Journal of Neuroscience Research*, **18**: 75-81.

CURRY,Jr T.E., LAWRENCE,Jr I.E. y BURDEN,H.W. (1983). Ovarian follicular development following exogenous gonadotropin stimulation in the prepubertal guinea pig: effect of unilateral 6-hydroxydopamine. *Federation Proceedings*, **42**: 316.

CHÁVEZ,R., CARRIZOSA,L. y DOMÍNGUEZ,R. (1991). Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rats. *Medical Science Research*, **19**: 41-42.

CHUN,S.Y., BILLING,H., TILLY,J.L., FURUTA,I., TSAFIRI,A. y HSUEH,A.J.W. (1994). Gonadotropin suppression of apoptosis in cultured preovulatory follicles: mediatory role of endogenous insulin-like growth factor I. *Endocrinology*, **135**: 1845-1853.

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

DEES,W.L., HINEY,J.K., SCHULTEA,T.D., MAYERHOFER,A.,DANILCHIK,M., DISSEN,G.A. y OJEDA,S.R. (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology*, **136**: 5760-5768.

DISSEN,G.A., HILL,D.F., COSTA,M.E., MA,Y.J. y OJEDA,S.R. (1991). Nerve growth factor receptors in the peripubertal rat ovary. *Molecular Endocrinology*, **5**: 1642-1650.

DISSEN,G.A., HIRSHFIELD,A.N. MALAMED,S. y OJEDA,S.R. (1995). Expression of neurotrophins and their receptors in the mammalian ovary is developmentally regulated: changes at the time of folliculogenesis. *Endocrinology*, **136**: 4681-4692.

DISSEN,G.A., MALAMED,S., GIBNEY,J.A., HIRSHFIELD,A.N., COSTA,M.E. y OJEDA,S.R. (1992). Neurotrophins are required for follicular formation in the mammalian ovary. *Abstract 463.10. 22ND ANNUAL MEETING. SOCIETY FOR NEUROSCIENCE.*

DOHLER,K.D. y WUTTKE,W. (1974). Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*, **94**: 1003-1008.

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

DONNERER,J., HUMPEL,C. y SARIA,A. (1992). Effect of noradrenergic denervation by neonatal DSP-4 on peptide neurotransmitter systems in the rat brain. *Neuropeptides*, **22**: 103-106.

DYER,A.C. y ERICKSON,G.F. (1985). Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology*, **116**: 1645-1652.

ELIOT,R.J., KLEIN,A.H., GLATZ,T.H., NATHANIELSZ,P.W. y FISHER,D.A. (1981). Plasma norepinephrine, epinephrine, and dopamine concentrations in maternal and fetal sheep during spontaneous parturition and in premature sheep during cortisol-induced parturition. *Endocrinology*, **108**: 1678-1682.

ERANKO,O. y ERANKO,L. (1971). Histochemical evidence of chemical sympathectomy by guanethidine in newborn rats. *Histochemical Journal*, **3**: 451-455.

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

EVANS,B., HEATH,J.W. y BURNSTOCK,G. (1979). Reinnervation following guanethidine-induced sympathectomy of adult rats. *Journal of Neurocytology*, **8**: 381-400.

EVANS,B., IWAYAMA,T. y BURNSTOCK,G. (1973). Long-lasting supersensitivity of the rats vas deferens to norepinephrine after chronic guanethidine administration. *Pharmacology and Experimental Therapeutics.*, **185**: 60-69.

FAVRE-MAURICE,R., DE HAUT,M., DALMAZ,Y. y PEYRIN,L. (1992). Differential effect of guanethidine on dopamine and norepinephrine in rat peripheral tissues. *Journal of Neural Transmission*, **88**: 115-126.

FELTEN,D.L., ACKERMAN,K.D., WIEGAND,S.J. y FELTEN,S.Y. (1987). Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: I. Nerve fibers associate with lymphocytes and macrophages in specific compartments of the splenic white pulp. *Journal of Neuroscience Research*, **18**: 28-36.

FELTEN,S.Y., FELTEN,D.L., BELLINGER,D.L., CARLSON,S.L., ACKERMAN,K.D., MADDEN,K.S., OLSCHOWKA,J.A. y LIVNAT,S. (1988). Noradrenergic sympathetic innervation of lymphoid organs. *Progress in Allergy*, **43**: 14-36.

FELTEN,S.Y. y OLSCHOWKA,J.A. (1987). Noradrenergic sympathetic innervation of the spleen: II. Tyrosine hydroxylase (TH)-positive nerve terminals form synaptic like contacts on lymphocytes in the splenic white pulp. *Journal of Neuroscience Research*, **18**: 37-48.

FERNANDES XAVIER,F., DOUCET,G., GEFFARD,M. y DESCARRIES,L. (1994). Dopamine neoinnervation in the substantia nigra and hyperinnervation in the interpeduncular nucleus of adult rat following neonatal cerebroventricular administration of 6-hydroxydopamine. *Neuroscience*, **59**: 77-87.

FLAWS,J.A., DeSANTI,A., TILLY,K.I., JAVID,R.O., KUGU,K., JOHNSON,A.L., HIRSHFIELD,A.N. y TILLY,J.L. (1995). Vasoactive intestinal peptide-mediated suppression of apoptosis in the ovary: potential mechanisms of action and evidence of a conserved antiapoptogenic role through evolution. *Endocrinology*. **136**: 4351-4359.

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

FORTUNE,J.E. (1994). Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction*, **50**: 225-232.

GALLO,R.V. (1981). Further studies on dopamine-induced suppression of pulsatile LH release in ovariectomized rats. *Neuroendocrinology*, **32**: 187-192.

- GEORGE,F.W. y OJEDA,S.R. (1987). Vasoactive intestinal peptide induces aromatase activity before development of primary follicles and responsiveness to FSH. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA*, **84**: 5803-5807.
- GERENDAI,I., MARCHETTI,B., MAUGERI,S., ROSAS,M.A. y SCAPAGNINI,V. (1978). Prevention of compensatory ovarian hypertrophy by local treatment of the ovaries with 6-OHDA. *Neuroendocrinology*, **27**: 272.
- GORE-LANGTON,R.E. y ARMSTRONG,D.T. (1994). Follicular steroidogenesis and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y J.D. Neill Eds., 2ª ed. vol. I, Raven Press, New York, 571- 627.
- HAGE,A.J., GROEN-KLEVANT,A.C. y WELSCHEN,R. (1978). Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta Endocrinologica,(Copenh.)*, **88**: 375-382.
- HEATH,J.W. y BURNSTOCK,G. (1977). Selectivity of neuronal degeneration produced by chronic guanethidine treatment. *Journal of Neurocytology*, **6**: 397-405.
- HERNANDEZ,E.R., JIMENEZ,J.L., PAYNE,D.W. y ADASHI,E.Y. (1988). Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via β -adrenergic theca-interstitial cell recognition sites. *Endocrinology*, **122**: 1592-1602.
- HIRSHFIELD,A.N. (1986). Effect of a low dose of pregnant mare's serum gonadotropin on follicular recruitment and atresia in cycling rats. *Biology of Reproduction*, **35**: 113-118.
- HIRSHFIELD,A.N. y MIDGLEY Jr., A.R. (1978). The role of FSH in the selection of large ovarian follicles in the rat. *Biology of Reproduction*, **19**: 606-611.
- HOHMANN, M., KEVE, T.M., OSOL, G. y McLAUGHLIN. (1990). Norepinephrine sensitivity of mesenteric veins in pregnant rats. *American Journal of Physiology*, **259**: R753-759.
- HSUEH, A.J.W., BILLIG,H. y TSAFRIRI,A. (1994). Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews*, **15**: 707-724.
- JAIM-ETCHEVERRY,G. y ZIEHER,L.M. (1971). Permanent depletion of peripheral norepinephrine in rats treated at birth with 6- hydroxydopamine. *European Journal Pharmacology*, **13**: 272-276.
- JAIM-ETCHEVERRY,G. y ZIEHER,L.M. (1980). DSP4: A novel compound with neurotoxic effects on noradrenergic neurons of adult and developing rats. *Brain Research*, **188**: 513-523.
- JOHNSON,A.L., LI,Z., GIBNEY,J.A. y MALAMED,S. (1994). Vasoactive intestinal peptide-induced expression of cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage and 17α -hydroxylase enzyme activity in hen granulosa cells. *Biology of Reproduction*. **51**: 327-333.

JOHNSON Jr.,E.M. y MANNING,P.T. (1984). Guanethidine-induced destruction of sympathetic neurons. *European Journal Pharmacology*, **37**: 45-54.

JOHNSON Jr., E.M., O'BRIEN, F. y WERBITT, R. (1976). Modification and characterization of permanent sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rats. *International Review of Neurobiology*, **25**: 1-37.

KANNISTO,P., OWMAN,Ch. y WALLES,B. (1985). Involvement of local adrenergic receptors in the process of ovulation in gonadotrophin-primed immature rats.. *Journal of Reproduction and Fertility*, **75**: 357-362.

KIDD,G.J., HEATH,J.W., TRAPP,B.D. y DUNKLEY,P.R. (1992). Myelin sheath survival after guanethidine-induced axonal degeneration. *Journal of Cell Biology*, **116**: 395-403.

KIM,K. y RAMIREZ,V.D. (1982). *In vitro* progesterone stimulates the release of luteinizing hormone-releasing hormone from superfused hypothalamic tissue from ovariectomized estradiol-primed prepubertal rats. *Biology of Reproduction*, **111**: 750-757.

KLEIN,C.M., RAY,R.H. y BURDEN,H.W. (1989). Direct electrical stimulation of the superior ovarian nerve in rats causes an increase in neuronal activity in the ipsilateral ovarian plexus nerve. *Brain Research*, **479**: 194-200.

KOSTRZEWA,R.M. y JACOBOWITZ,D.M. (1974). Pharmacological actions of 6-hydroxydopamine. *Pharmacological Reviews*, **26**: 199-288.

KRUKOFF,T.L., FERNANDEZ,M.C. y VINCENT,D.H. (1990). Effects of neonatal sympathectomy with 6-hydroxydopamine or guanethidine on survival of neurons in the intermediolateral cell column of rat spinal cord. *Journal of the Autonomic Nervous System*, **31**: 119-126.

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

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

LAWRENCE,I.E.Jr. y BURDEN,H.W. (1976). The autonomic innervation of the Interstitial gland of the rat ovary during pregnancy. *American Journal of Anatomy*, **147**: 81-94.

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

LEGRAND,C. y MALTIER,J.P. (1986). Evidence for a noradrenergic transmission in the control of parturition in the rat. *Journal of Reproduction and Fertility*, **76**: 415-424.

LEPHART, E.D. y OJEDA, S.R. (1990). Hypothalamic aromatase activity in male and female rats during peripubertal development. *Neuroendocrinology*, **51**: 385-393.

LEPHART, E.D., SIMPSON, E.R., McPHAUL, M.J., KILGORE, M.W., WILSON, J.D. y OJEDA, S.R. (1992). Brain aromatase cytochrome P-450 messenger RNA levels and enzyme activity during prenatal and perinatal development in the rat. *Molecular Brain Research*, **16**: 187-192.

LEPOSAVIC, G., MICIC, M., UGRESIC, N., BOGOJEVIC, M. y ISAKOVIC, K. (1992). Components of sympathetic innervation of the rat thymus during late fetal and postnatal development: hystofluorescence and biochemical study. *Thymus*, **19**: 77-87.

LO, M., JULIEN, C., BARRES, C., BOOMSMA, F., CERUTTI, C., VINCENT, M. y SASSARD (1991). Blood pressure maintenance in hypertensive sympathectomized rats. I Adrenal medullary catecholamines. *American Journal of Physiology*, **261**: R1045-R1051.

LORTON, D., HEWITT, D., BELLINGER, D.L., FELTEN, S.Y. y FELTEN, D. (1990). Noradrenergic reinnervation of the rat spleen following chemical sympathectomy with 6-Hydroxydopamine: pattern and time course of reinnervation. *Brain, Behavior, and Immunity*, **4**: 198-222.

MAGOFFIN, D.A. y WEITSMAN, S.R. (1993). Insulin-like growth factor-I stimulates the expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid in ovarian theca-interstitial cells. *Biology of Reproduction*, **48**: 1166-1173.

MALAMED, S., GIBNEY, J.A. y OJEDA, S.R. (1992). Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Research*, **270**: 87-93.

MACKINNON, P.C.B., MATTOCK, J.M. y TER HAAR, M.B. (1976). Serum gonadotrophin levels during development in male, female and androgenized female rats and the effect of general disturbance on high luteinizing hormone levels. *Journal of Endocrinology*, **70**: 361-371.

MANNING, P.T., POWERS, C.W., SCHMIDT, R.E. y JOHNSON Jr., E.M., (1983). Guanethidine-induced destruction of peripheral sympathetic neurons occurs by an immune-mediated mechanism. *Journal of Neuroscience*, **3**: 714-724.

MARSHALL, J.M. (1973). Effects of catecholamines on the smooth muscle of the female reproductive tract. *Annual Review of Pharmacology*, **13**: 19-32.

MASSMANN, G.A., FIGUEROA, J.P., HOFFMAN, G. y NATHANIELSZ, P.W. (1992). Role of the sympathetic innervation on uterine electromyographic activity in nonpregnant ovariectomized sheep under estrogen supplementation. *Biology of Reproduction*, **46**: 483-491.

MATSUMOTO, T. y DUCSAY, C. (1992). Maternal plasma catecholamines in the Rhesus Macaque during late gestation: effect of photoperiod and timed melatonin infusion. *Biology of Reproduction*, **47**: 582-587.

MAXWELL,R.A. (1982). Guanethidine after twenty years: a pharmacologist's perspective. *Brain Journal Clinical of Pharmacology*, **13**: 35-44.

MAYERHOFER,A., DISSEN,G.A., DEES,W.L., COSTA,M.E. y OJEDA,S.R. (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, **138**: 3390-3329.

McDONALD,E.J. y AIRAKSINEN,M.M.(1974).The effect of 6-hydroxydopamine on the oestrus cycle and fertility of rats. *Journal of Pharm. Pharmacology.*, **26**: 518-521.

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

McGEE,E., SPEARS,N., MINAMI,S., HSU,S.-Y., CHUN,S.-Y., BILLIG,H. y HSUEH,A.J.W. (1997). Preantral ovarian follicles in serum-free culture: suppression of apoptosis after activation of the cyclic guanosine 3'5'-monophosphate pathway and stimulation of growth and differentiation by follicle-stimulating hormone. *Endocrinology*, **138**: 2417-2424.

McNUTT,C.M. y DUCSAY, C. (1991). Catecholamines and uterine activity rhythms in the pregnant rhesus macaque. *Biology of Reproduction*, **47**: 582-587.

MEIJS-ROELOFS,H.M.A., KRAMER,P. y SANDER,H.J. (1983). Changes in serum concentrations of luteinizing hormone in the female rat approaching puberty. *Journal of Endocrinology*, **98**: 241-249.

MERCHANT, H.L. (1991). Gametogénesis. En: Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. *DOMÍNGUEZ,C.R. Eds. Miguel Angel Porrúa, México.* 9-39.

MIONE,M.C., CAVANAGH,J.F.R., KIRKPATRICK,K.A. y BURNSTOCK,G. (1992). Long-lasting supersensitivity of the rats vas deferens to norepinephrine after chronic guanethidine administration. *Cell Tissue Research*, **185**: 60-69.

MORALES,L., CHAVEZ,R., AYALA,M.E. y DOMÍNGUEZ,R. (1998). Effects of the unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats, on the ovulatory response to gonadotrophins administration. *Journal of Endocrinology*, **158**: 213-219.

MORALES,L., CHAVEZ,R. y DOMÍNGUEZ,R. (1993). Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Medical Science Research*, **21**: 15-17.

MUELLER,R.A., THOENEN,H. y AXELROD,J. (1969). Adrenal tyrosine hydroxylase: compensatory increase in activity after chemical sympathectomy. *Science*, **163**: 468-469.

OJEDA,S.R., ADVIS,J.P. y ANDREWS,W.W. (1980a). Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation Proceeding*, **39**: 2365-2371.

OJEDA, S.R., ANDREWS, W.W., ADVIS, J.P. y WHITE, S. (1980b). Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Reviews*, 1: 228-257.

OJEDA, S.R., DISSEN, G.A. y JUNIER, M.P. (1992). Neurotrophic factors and female sexual development. *Frontiers in Neuroendocrinology*, 13: 120-162.

OJEDA, S.R., JAMESON, H.E. y McCANN, S.M. (1977). Developmental changes in pituitary responsiveness to luteinizing hormone-releasing hormone in the female rat: ovarian-adrenal influence during the infantile period. *Endocrinology*, 100: 440-451.

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

OJEDA, S.R., URBANSKI, H.F. y AHMED, C.E. (1986). The onset of female puberty: studies in the rat. *Recent. Progress in Hormone Research*, 42: 382-442.

PAPENFUSS, F., BODIS, J., TINNEBERG, H.-R. y SCHWARTZ, H. (1993). The modulatory effect of catecholamines on gonadotropin-stimulated granulosa cell steroid secretion. *Archives of Gynecology and Obstetrics*, 253: 97-102.

PAPKA, R.E., COTTON, J.P. y TRAUIG, H.H. (1985). Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-, vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell Tissue Research*, 242: 475-490.

PATON, D.M., WIDDICOMBE, J.H., RHEAUME, D.E. y JOHNS, A. (1978). The role of the adrenergic innervation of the oviduct in the regulation of mammalian ovum transport. *Pharmacological Reviews*, 29: 67-102.

PEDERNERA, E. (1993). Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: *Comunicación Neuroendócrina. Bases Celulares y Moleculares*. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, pp. 33-46.

PETER, H. (1970). Some aspects of early follicular development. En: *Ovarian Follicular Development and Function*. Midgley, A.R., Sadler, W.A., Eds. Raven Press, Nueva York. pp. 1-3.

PLANT, T.M. (1994). Puberty in Primates. En: *The Physiology of Reproduction*. E. Knobil y J.D. Neill Eds., 2ª ed. vol. II, Raven Press, New York, pp. 453-485.

RATNER, A., SANBORN, C.R. y WEISS, G.K. (1980). β -Adrenergic stimulation of cAMP and progesterone in rat ovarian tissue. *American Journal of Physiology*, 239: E139-E143.

RIBONI, L., ESCAMILLA, C., CHAVIRA, R. y DOMÍNGUEZ, R. (1998). Effects of peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine administration on the mechanisms regulating puberty in the female guinea pig. *Journal of Endocrinology*, 156: 91-98.

RIVIER,C. y VALE,W. (1987). Inhibin: measurement and role in the immature female rat. *Endocrinology*, **120**: 1688-1690.

ROCHE,P.J., PARKINGTON,H.C. y GIBSON,W.R. (1985). Pregnancy and parturition in rats after sympathetic denervation of the ovary, oviduct and uterine junction. *Journal of Reproduction and Fertility*, **75**: 653-661.

ROSA-E-SILVA, A.A.M., PRAJIANTE,T.M., ALMEIDA,F.H.S., GUIMARAES,M.A. y LUNARDI,L.O. (1997). Ovarian granulosa and theca interstitial cells: a morphological and physiological analysis in guanethidine denervated rats at puberty. *Cellular and Molecular Biology*, **43**: 409-416.

SAARI,M.J., NOBREGA,J.N., ARMSTRONG,J.N., PAPPAS,B.A.y COSCINA,D.V. (1990). Neonatal 6-hydroxydopamine alters the behavior of enriched-impoverished rats in a novel test environment. *Behavioral Neuroscience*, **104**: 430-437.

SANDER,H.J.,MEIJS-ROELOFS,H.M.A., KRAMER,P., VAN LEEUWEN,E.C.M. (1987). Inhibin-like activity in ovarian homogenates of prepubertal female rats and its physiological significance. *Journal of Endocrinology*, **107**: 251-257.

SAUNDERS,N.R. (1977). Ontogeny of the blood-brain barrier. *Experimental Eye Research (Suppl.)*: 523-550.

SCHMIDT,R.E., PH.D.,M.D., SUMMERFIELD,A.L. y HICKEY,W. (1990). Ultrastructural and immunohistologic characterization of guanethidine-induced destruction of peripheral sympathetic neurons. *Journal of Neuropathologic and Experimental Neurology*, **49**: 150-167.

SHANNON,N.J., GUNNET,J.W. y MOORE,K.E. (1986). A comparison of biochemical indices of 5-hydroxytryptaminergic neuronal activity following electrical stimulation of the dorsal raphe nucleus. *Journal of Neurochemical*, **47**: 958-965.

SKINNER,M.K. y PARROT,J. (1994). *Growth factor-mediated cell-cell interactions in the ovary*. En: Molecular Biology of the Female Reproductive System. FINDLAY,J.K. Eds. Academic Press, USA. 67-81.

SNYDER,G., KELLER,R. y ZIGMOND,M. (1990). Dopamine efflux from striatal slices after intracerebral 6-hydroxydopamine: evidence for compensatory hyperactivity of residual terminals. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, **253**: 867-876.

STEFENSON,A., OWMAN,Ch., SJOBERG,N.O., SPORRONG,B. y WALLES,B. (1981). Comparative study of the autonomic innervation of the mammalian ovary, with particular regard to the follicular system. *Cell Tissue Research*, **215**: 47-62.

STEVENS-FELTEN,S.Y. y BELLINGER,D.L. (1997). Noradrenergic and peptidergic innervation of lymphoid organs. En: **Neuroimmunoendocrinology**. Blalock,J.E., Ed., 3ª ed., vol. 69, Karger, Basel, Switzerland, pp. 99-131.

THOENEN,H., MUELLER,R.A. y AXELROD,J. (1969). Trans-synaptic induction of adrenal tyrosine hydroxylase. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, 169: 249-254.

TILLY,J.L. (1996). Apoptosis and ovarian function. **Reviews of Reproduction**, 1: 162-172.

TRANZER,J.P. y THOENEN,H. (1968). An electron microscopic study of selective, acute degeneration of sympathetic nerve terminals after administration of 6-hydroxydopamine. **Experientia**, 24: 155-156.

TRKULJA,V. y LACKOVIC,Z. (1996). Involvement of muscarinic receptors in the control of female puberty in the rat. **European Journal of Pharmacology**, 297: 93-96.

URBANSKI,H.F. y OJEDA,S.R. (1983). The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. **Endocrinology**, 117: 644-649.

URBANSKI,H.F. y OJEDA,S.R. (1987). Gonadal-independent activation of enhanced afternoon luteinizing hormone release during pubertal development in the female rat. **Endocrinology**, 121: 907-913.

VAN VOORHIS,B.J. (1998). Follicular development. En: Encyclopedia of Reproduction. E. Knobil y J.D. Neill Eds., vol. II, Academic Press, San Diego, California, USA, pp. 376-389.

VAZQUEZ,F.G.C. (1997). Estudio de la pérdida de la función reproductiva en la rata hembra, posible participación del sistema catecolaminérgico en la disminución de la respuesta ovárica a las gonadotropinas. (**Tesis de Licenciatura**), Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

WEINER, C. , LIU, K.Z., THOMPSON, HERRIG, J. y CHESTNUT,D. (1991). Effect of pregnancy on endothelium and smooth muscle: their role in reduced adrenergic sensitivity. **American Journal of Physiology**. 261: H1275-H1283.

WEINER, N. y MOLINOFF,P.B. (1994). Catecholamines. En: **Basic Neurochemistry**. Siegel,G.J. et al Eds., 5ª ed. Raven Press, New York:261-281.

WILLIAMS,J.M., PETERSON,R.G., SHEA,P.A., SCHDMEDTJE,J.F., BAUER,D.C. y FELTEN,L. (1981). Sympathetic innervation of murine thymus and spleen: evidence for a functional link between the nervous and immune systems. **Brain Research Bulletin**, 6: 83-94.

WILLOUGHBY,J.O. Y DAY., T.A. (1981). Central catecholamine depletion: effects on physiological growth hormone and prolactin secretion. **Neuroendocrinology**, 32: 65-69.

WRUTNIAK-ZOLNOWSKA,T. (1980). Changes of the secretory activity of ovarian chromaffin cells during the sex cycle of female white rats. *Endokrinologie*, **76**: 279-287.

WUTTKE,W., HONMA,K., LAMBERTS,J. y HOHN,K.G. (1980). The role of monoamines in female puberty. *Federation Proceedings*, **39**: 2378-2383.

XU,J. y LING,EA (1994). Studies of the ultrastructure and permeability of the blood-brain barrier in the developing corpus callosum in postnatal rat brain using electron dense tracers. *Journal of Anatomy*, **184**: 227-237.

ZOCHODNE,D.W., HUANG,Z., WARD,K. y LOW,P.A. (1990). Guanethidine-induced adrenergic sympathectomy augments endoneurial perfusion and lowers endoneurial microvascular resistance. *Brain Research*, **519**: 112-117.