

51262 2



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

PARTICIPACION DE LA INERVACION SENSORIAL DEL OVARIO SOBRE LA PUBERTAD Y EL DESARROLLO FOLICULAR EN LA RATA HEMBRA.

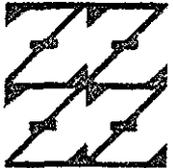
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS EN BIOLOGIA (SISTEMAS HUMANOS)

P R E S E N T A : CAROLINA MORAN RAYA



UNAM FES ZARAGOZA



LO HOMBROS S/2 DE NUESTRA ESPERANZA

DIRECTORA DE TESIS: DRA LETICIA MORALES TEDESMA DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACION

MEXICO, D.F.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

OCTUBRE DEL 2001



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO

Participación de la inervación sensorial del ovario sobre la pubertad y el desarrollo folicular en la rata hembra.

Autor: Carolina Morán Raya

Directora: Dra Leticia Morales Ledesma

La tesis fue desarrollada en el laboratorio de Fisiología Reproductiva, que pertenece a la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción. FES Zaragoza UNAM.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo de DGAPA (PAPIIT) proyecto IN203799 y de CONACyT 29006N.

México D.F.

Octubre del 2001

DEDICATORIA

A LA MEMORIA DE
LUIS MORÁN BARRETO

A LOS TRES LUCEROS QUE ILUMINAN MI COSMOS

BRENDA ISABEL RUVALCABA MORÁN

TANIA CAROLA RUVALCABA MORÁN

EDGAR RAÚL RUVALCABA SALAZAR

A MI FAMILIA QUERIDA

VICTORIA RAYA

SUSANA, MARICELA, RODOLFO Y JAIME

A ANGELA MORÁN Y SALVADOR LÓPEZ

A MA. LUISA MORÁN Y JORGE TREJO

A LA FAMILIA RUVALCABA SALAZAR

A MANUEL

A MIS AMIGAS LORENA Y JUANA

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

AGRADECIMIENTOS

A los miembros del jurado:

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Laura Ribono Rodríguez

Dra. Margarita González Del Pliego Olivares

Dra. Ma. Esther Cruz Beltrán

Dr. Roberto Domínguez Casalá.

Por su valiosa participación en la realización de este proyecto y en la revisión del escrito, mil gracias.

A Javier Apolonio, Ubaldo Quiróz, Rocio Selene Razo y Rocio Betanzos, por su amistad y compañerismo.

A los compañeros de la Unidad les agradezco su confianza y apoyo

A la señora Ma Luisa Illescas Vera por su apoyo en la parte de histología y también por su amistad

A la MVZ Adriana Altamirano, directora del Bioterio y a todos los trabajadores de este centro por su apoyo profesional en la proporción de animales

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Esta Tesis se basa en los siguientes trabajos:

Carolina Morán, Leticia Morales, Ubaldo Quiróz y Roberto Domínguez. 1998. Efectos de la denervación sensorial sobre la pubertad de la rata hembra XXIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. Cuernavaca Morelos.

Carolina Morán, Rocío Selene Razo, Leticia Morales y Roberto Domínguez. 2000. Efectos de la desnervación sensorial sobre la pubertad. XXV Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. Taxco, Guerrero

Morán, C. Morales L, Quiróz, U y Domínguez, R. 2000 Efectos de la inyección de capsaicina (cap) al nacimiento sobre el ovario de la rata prepúber XLIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. XX Congreso latinoamericano de Ciencias Fisiológicas Cancún, Quintana Roo

Carolina Morán, Leticia Morales, Roberto Chavira y Roberto Domínguez. 2001. Efectos de la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina al nacimiento, sobre la esteroidogénesis y el desarrollo folicular durante la etapa juvenil de la rata. XXVI Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. Acapulco Guerrero.

ÍNDICE

Resumen	i
Introducción	2
• Aspectos anatómicos de la distribución de la inervación en el ovario...	2
• Estudios de marcaje anterogrado y retrógrado hacia y desde el sistema nervioso central	4
• Aspectos funcionales de la inervación sensorial en el sistema reproductor	7
• Farmacología de la capsaicina	9
• Relación entre la inervación sensorial y la simpática	15
• Desarrollo folicular e inervación	17
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	22
Objetivo general	22
Objetivos particulares	22
Material y Método	23
Resultados	27
• Estudio de los efectos de la administración sistémica de capsaicina al nacimiento sobre la pubertad, la ovulación, la esteroidogénesis y el crecimiento folicular	27
• Efectos de la denervación sensorial sobre el desarrollo y diferenciación del folículo ovárico de la rata púber	28
• Estudio del efecto de la capsaicina en la etapa neonatal sobre la ovulación inducida en la rata juvenil	32
• Estudio de los efectos de la denervación sensorial en la tasa de fertilidad de la rata hembra adulta	33
• Estudio de los efectos de la denervación sensorial sobre el desarrollo y diferenciación del folículo ovárico, la esteroidogénesis y la concentración de noradrenalina ovárica en la rata en diferentes edades del periodo juvenil	34
Discusión	42
Conclusiones	48
Modelo	49
Bibliografía	51
Publicaciones	60

RESUMEN

Las funciones del ovario, secreción de hormonas y ovulación, son reguladas por las gonadotropinas hipofisarias, las propias hormonas secretadas por el órgano y por la inervación que recibe, la cual modula, entre otras, la respuesta del folículo a las gonadotropinas

En el presente estudio se analizaron los efectos de la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina (50mg/kg de peso) al nacimiento sobre los procesos de pubertad, ovulación espontánea e inducida, preñez, concentración de esteroides y en el desarrollo folicular en la pubertad y durante algunas edades de la etapa juvenil.

En los animales denervados se observó un retraso significativo de la pubertad, medida por la edad de la apertura vaginal y el primer estro. El número de ovocitos liberados por ambos ovarios, fue menor que en los animales testigo absoluto o tratados con el vehículo. El número de folículos medidos en los ovarios de los animales tratados con capsaicina al nacimiento fue significativamente menor que en los tratados con el vehículo, acompañado por un incremento en el porcentaje de atresia folicular.

Todos los animales denervados al ser colocados con machos fértiles, copularon y presentaron tapón espermático, pero sólo 3/15 quedaron preñadas y parieron a término. El número de ovocitos liberados por los animales denervados, tratados con PMSG o PMSG-hCG fue significativamente menor que el de los animales intactos estimulados con gonadotropinas

En los ovarios de los animales denervados y sacrificados a los 20 ó 28 días de edad, el diámetro folicular promedio fue menor que el de los testigos, mientras que a los 32 días fue mayor. El número total de folículos contados en los animales de 20 y 28 días de edad estuvo aumentado, debido principalmente a un mayor número de los folículos con diámetro menor de 200µm. En los ovarios de los animales sacrificados a los 32 días de edad se observa incremento en el número de folículos con diámetro mayor a 350µm, de los cuales la mayoría presenta características de atresia.

La concentración de progesterona en el suero de los animales denervados fue menor en todas las edades estudiadas, siendo esta diferencia significativa en los animales sacrificados a los 24, 28 ó 32 días de edad. La concentración de estradiol fue menor que sus respectivos testigos, sólo en los animales sacrificados a los 28 días de edad.

Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan la idea de que la inervación sensorial participa en la regulación del crecimiento y la maduración folicular. Y en la regulación de la secreción de progesterona por el ovario por medio de un circuito neurohormonal que une al ovario con el sistema nervioso central

INTRODUCCIÓN

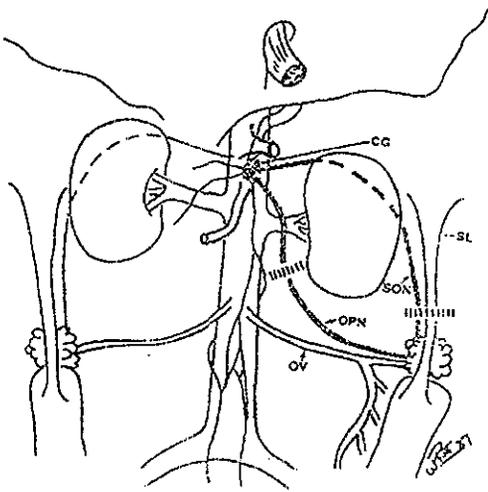
ASPECTOS ANATÓMICOS DE LA DISTRIBUCIÓN DE LA INERVACIÓN EN EL OVARIO.

Las funciones del ovario son reguladas por las hormonas hipotalámicas e hipofisiarias y por señales neurales directas. La inervación del ovario y del sistema reproductor en general, incluye componentes simpáticos, parasimpáticos y sensoriales del sistema nervioso autónomo y llega al ovario por medio del plexo ovárico, el nervio ovárico superior y el nervio vago. Las terminales de dichos nervios liberan al interior de la glándula una serie de neurotransmisores entre los que se encuentran la noradrenalina (NA) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), los que han sido considerados como reguladores de la esteroidogénesis y el desarrollo folicular temprano (Dissen y col. 1993, Hsueh y col. 1994, Mayerhofer y col. 1997).

Las fibras del nervio ovárico superior y del plexo ovárico se consideran predominantemente de tipo catecolaminérgico, aunque también poseen fibras inmunoreactivas al VIP, a la sustancia P (SP) y al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Dichas fibras llegan al ovario por vías diferentes: Las fibras VIPérgicas llegan al ovario por medio del nervio ovárico superior, mientras que las que contienen SP y CGRP lo hacen por el plexo ovárico (Dees y col. 1986; Klein y Burden 1988b). Las fibras inmunoreactivas a la SP y a CGRP, comúnmente relacionadas con la inervación sensorial, se encuentran asociadas principalmente con los vasos sanguíneos, mientras que las VIPérgicas están en contacto con el tejido intersticial de la glándula (Kannisto y col. 1986).

El plexo ovárico se origina en los plexos aórtico y renal cuyos cuerpos celulares preganglionares se localizan en los segmentos T10 y T11 de la médula espinal. El nervio ovárico superior es una rama del plexo celiaco, sus cuerpos celulares están presentes en los segmentos T7 a L2 de la raíz dorsal y en los

segmentos T10 a L3 del ganglio paravertebral; dicho nervio transita por el borde



Esquema 1. Trayecto que siguen los nervios ováricos. CG, ganglio celiaco; SL, ligamento suspensorio del ovario; SON, nervio ovárico superior; OPN, nervio del plexo ovárico; OV, vena ovárica. Tomado de Klein y Burden 1988.

del ligamento suspensorio (Lawrence y Burden, 1980; Burden, 1985; Klein y Burden, 1988a) (Esquema 1).

Las fibras sensoriales que se localizan en el ovario se originan en los segmentos T9-T11 y L2-L4 de la médula espinal y arriban al órgano por el plexo ovárico (McNeill y Burden 1987; Klein y Burden 1988a; Nance y col. 1988; Papka y col 1996).

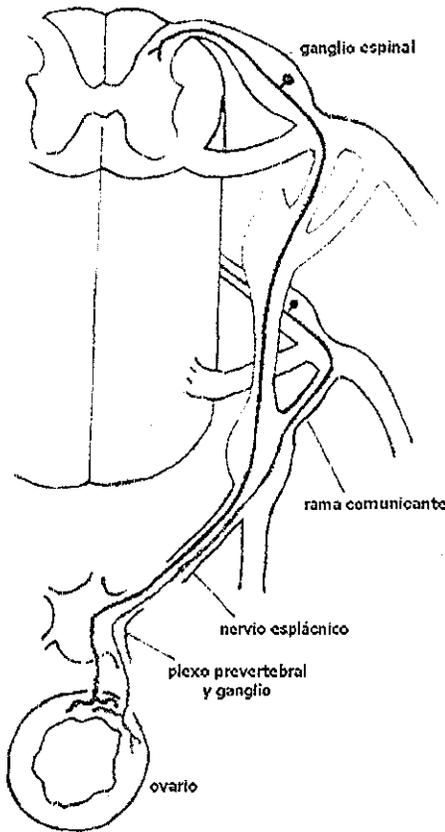
La inervación parasimpática que recibe el ovario proviene del nervio vago (Hill, 1962, Burden y Lawrence, 1977) y de los niveles S2-S4 de la médula espinal y llegan al ovario por medio del plexo hipogástrico (Mitchel, 1988), aunque algunos autores mencionan que este plexo no contribuye a la inervación del ovario (Burden, 1985). El soma de las neuronas que inervan al ovario y que provienen del nervio vago, se localizan en el ganglio nodoso y en las células ganglionares de la raíz dorsal de los segmentos T10 a L2 (Burden y col. 1983a) El nervio vago contiene fibras mielinizadas y no mielinizadas. A nivel del diafragma, la media del número de axones mielinizados es de 82 ± 9.7 y de 9489 ± 370 para los no mielinizados. El diámetro de los axones no mielinizados está en el rango de 0.25 a $1.0 \mu\text{m}$ (Gabella y Pease, 1973) Se ha mostrado que no hay diferencias en la

cantidad de fibras que transcurren por el vago izquierdo y el derecho; mientras que Powley y col. (1983) reportan que hay un entrecruzamiento de fibras accesorias del lado izquierdo al derecho por debajo del diafragma.

Las neuronas sensoriales aferentes no sólo tienen la función sensorial sino que también forman parte de los sistemas efectores locales donde están involucradas por ejemplo, en la respuesta inflamatoria a la irritación y a lesiones de los tejidos (Holzer, 1988). Esto implica que las terminales sensoriales tienen la característica de conducir impulsos antidrómicos. Las fibras sensoriales que arriban al ovario presentan características similares a las que inervan otros órganos viscerales; tienen como péptidos marcadores a la SP y al CGRP y al VIP; tienen soma pequeño y las fibras tienen muy poca o no presentan mielina (Traurig y col 1983, Holzer 1991). Los péptidos liberados por los nervios sensoriales ejercen su efecto al unirse a sus receptores en el órgano blanco. Las terminales sensoriales de termorreceptores o nociceptores son terminales nerviosas libres, sin estructuras accesorias y sus axones no están mielinizados o presentan muy poca mielina.

ESTUDIOS DE MARCAJE ANTERÓGRADO Y RETRÓGRADO HACIA Y DESDE EL SISTEMA NERVIOSO CENTRAL

Los nervios sensoriales del sistema nervioso autónomo se proyectan desde el corazón, pulmón, tracto intestinal, glándulas endocrinas, etc. a los ganglios sensoriales autonómicos. A nivel periférico se acompañan con los nervios simpáticos o parasimpáticos, mientras que a nivel central, entran al cuerno dorsal del núcleo sensorial en la base del cerebro (el núcleo del tracto solitario). Como regla general, las fibras que conducen impulsos nociceptores viscerales (sensación de dolor) siguen a los nervios simpáticos, mientras que los nervios parasimpáticos contienen fibras que conducen otros tipos de estímulos y hasta ahora no hay evidencias de fibras características a nociceptores en el nervio vago (Brodal 1996) (Esquema 2).



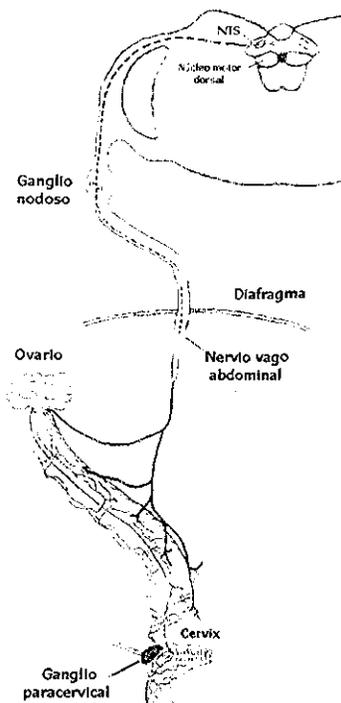
Esquema 2. Ilustración de las fibras sensoriales del sistema nervioso autónomo de los órganos viscerales. Nótese que las fibras pasan a través de plexo paravertebral y ganglios antes de entrar a los nervios espinales por las ramas comunicantes (Modificado de Brodal, 1996).

Que el ovario reciba inervación motora del sistema simpático y del parasimpático (por medio del nervio vago) y adicionalmente posea fibras aferentes que viajan por rutas simpáticas y vagales, permite sugerir la existencia de un eje neural ovario-hipotálamo, el cual pudiera estar involucrado en el control de las principales funciones del órgano. De las evidencias funcionales que apoyan esta hipótesis se encuentran los trabajos del grupo de Gerendai (1995,1997,2000), quienes al extirpar un ovario observan en el hipotálamo, en el mismo lado en el que se extrajo la gónada, incremento en el contenido del factor liberador de las

gonadotropinas (GnRH). Adicionalmente, las lesiones unilaterales en el hipotálamo, en áreas extrahipotalámicas, en la médula espinal o la sección del nervio vago, modifican algunas funciones ováricas (Gerendai y Halász, 1997). Advis y col. (1989), mostraron que a ratas inmaduras hipofisectomizadas a las que se les lesiona el lado izquierdo del área preóptica anterior del hipotálamo, presentan incremento significativo en la concentración de VIP intra-ovárico

La mayoría de las evidencias morfológicas obtenidas por estudios de marcaje transneuronal, indican que las vías por las que la información sensorial de los órganos reproductores es llevada al sistema nervioso central, es por medio de los nervios sensoriales que terminan en el cuerpo de la raíz dorsal y la sustancia gris intermedia. Una parte de la información aferente es liberada por la vía el tracto espino-solitario al núcleo del tracto solitario de la parte caudal de la base del cerebro y a través del núcleo gracilis. El núcleo del tracto solitario proyecta en parte a los núcleos paraventricular y supraóptico del hipotálamo, núcleos que están relacionados con la regulación de algunos procesos reproductivos (Collins y col. 1999) (Esquema 3).





Esquema 3. Sección de la parte caudal de la base del cerebro, el ganglio nodoso, el nervio vago y el curso hipotético que sigue hacia el ovario, el útero y el cervix. El ganglio paracervical está localizado adyacente al cervix uterino, cerca la unión entre el cervix con la vagina. NTS, núcleo del tracto solitario (Modificado de Collins y col. 1999)

ASPECTOS FUNCIONALES DE LA INERVACIÓN SENSORIAL EN EL SISTEMA REPRODUCTOR.

Según Nance y col. (1987) "la administración intratecal de capsaicina (fármaco que induce la destrucción de las fibras sensoriales tipo C y Aδ) a ratas adultas no tiene efectos en la duración del ciclo estral, la hipertrofia compensadora o el comportamiento sexual de la hembra. Sin embargo, los animales denervados mostraron una reducción significativa en la tasa de fertilidad, comparada con las ratas testigo". Los autores sugieren que la falta de información sensorial reduce la respuesta ante el estímulo cervico-vaginal inducida por la cópula sobre sistema nervioso central, que induce la preñez

Estudios realizados por Traurig y col. (1984) han mostrado que la administración de capsaicina en la etapa neonatal, además de modificar el crecimiento corporal en la etapa peripuberal, induce retraso en el inicio de la

pubertad, pero que cuando el animal llega al estado adulto presenta ciclos estrales normales. Sin embargo, la capacidad de aparearse (evaluado por la presencia de tapón espermático y espermatozoides en el frotis vaginal) en la tarde del proestro es significativamente menor comparada con el control. Así mismo, la respuesta decidual es marcadamente menor en las ratas denervadas. En trabajos posteriores, los autores observan que tanto la secreción de progesterona como la sensibilidad del útero a la misma, son normales en los animales tratados con capsaicina, y plantean que las alteraciones reproductivas son debidas a la falta de los impulsos aferentes que se producen durante la cópula, lo que facilita la secreción de progesterona por el cuerpo lúteo, la cual es necesaria para el mantenimiento de la preñez o la pseudo-preñez (Traurig y col. 1988).

De los primeros estudios que relacionan al nervio vago con las funciones del ovario, se encuentran los de Carlson y DeFeo (1965), quienes muestran que la vagotomía bilateral realizada a ratas adultas impide la respuesta decidual, el aumento en el peso del útero y de las concentraciones plasmáticas de progesterona que normalmente se presentan como respuesta a la estimulación cervical. Algunos autores proponen que las fibras aferentes del ovario, contenidas en el tronco anterior y posterior del vago, median los reflejos que pueden ayudar a controlar en forma muy fina algunas funciones del ovario (Burden y col, 1983a).

Estudios de nuestro laboratorio han mostrado que la sección uni o bilateral del nervio vago no modifica el patrón de ciclo estral (Cruz y col. 1986), mientras que modifica a la baja la tasa de animales ovulantes como el número de ovocitos liberados y este control es variable de acuerdo al día del ciclo en que se encuentre el animal y al nervio del que se trate (Cruz y col. 1986, Chávez y col. 1989).

Burden y colaboradores (1981) mostraron que la vagotomía abdominal altera el patrón de ciclo estral y la pseudo-preñez inducida por la estimulación cervical además de la secreción de prolactina y el incremento de progesterona, característico de la pseudo-preñez. En la rata preñada la vagotomía incrementa el número de reabsorciones fetales, evento acompañado de concentraciones bajas de

LH en la hipófisis (Burden y col. 1983b), lo que indica que la vagotomía afecta la síntesis o la liberación de LH y coloca al nervio vago como un componente en la ruta de señalización del eje hipotálamo-hipófisis-gónada

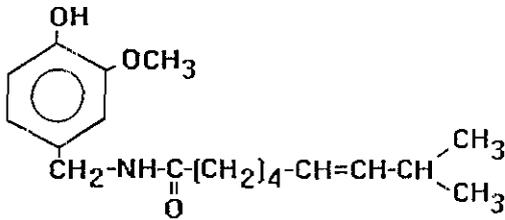
Ojeda y col. (1983) mostraron que la vagotomía bilateral realizada a ratas prepúberes induce retraso en la edad de la apertura vaginal y a nivel del ovario disminución de la actividad del complejo de enzimas de tipo aromatasas, lo que se traduce en una disminución de la secreción de estrógenos. No se observaron cambios en las concentraciones plasmáticas de FSH o LH ni en la cantidad de sus respectivos receptores en los ovarios, lo que indica que el papel de las gonadotropinas no se vería modificado por la falta de este tipo de inervación, pero sí afectaría la esteroidogénesis. Evidencias aportadas por nuestro laboratorio, muestran que en la rata púber la participación del nervio vago varía con la edad y, que la modulación que ejerce el vago izquierdo es diferente a la del derecho (Betanzos, 2001).

Una metodología frecuentemente empleada para estudiar la participación de la información sensorial en la fisiología de diversos órganos, es la utilización de la capsaicina, que es el componente activo del chile picante, el cual provoca una sensación de dolor ardiente. Este compuesto actúa por medio de la estimulación de un receptor de membrana, el cual ha sido localizado en neuronas aferentes primarias en los segmentos cervical, torácico y lumbar de la médula espinal, para finalmente llevar esa información de daño al sistema nervioso central (Holzer 1991, Szallazi 1994, Wardley y col. 1997).

FARMACOLOGÍA DE LA CAPSAICINA.

La capsaicina (8-metil-N-vanillil-6-nonenamida) es el principio activo de ciertos chiles picantes del género *Capsicum* la cual presenta una cadena de nueve carbonos con un doble enlace. Tiene la capacidad de inducir excitación intensa en un grupo selecto de fibras sensoriales con soma de diámetro pequeño y un mecanismo subsecuente de transmisión quimiosensible y de dolor térmico. Posee efectos neurotóxicos sobre neuronas sensoriales primarias que contienen sustancia

P Su estructura química se muestra en el esquema 4 (Burks y col., 1985; Holzer, 1991; Caterina, 1997)



Esquema 4. Fórmula química de la capsaicina. Tomada de Holzer, 1991

En el animal adulto, varias semanas después de la administración de la capsaicina, las neuronas primarias aferentes exhiben obvias señales de daño ultraestructural. En el animal neonato la capsaicina causa degeneración de neuronas y un deterioro permanente en los mecanismos de transmisión del dolor (Holzer, 1991).

Varios investigadores han mostrado que el tratamiento a ratas neonatas con capsaicina causa la destrucción de neuronas sensoriales primarias que contienen SP y CGRP y como resultado se da una marcada y permanente disminución de estos neurotransmisores en tejidos periféricos. El reconocimiento de la capsaicina con propiedades farmacológicas únicas ha facilitado las investigaciones de la función de la SP como un neurotransmisor de los nervios sensoriales (Burks y col. 1985).

La SP ha sido medida en el cuerno del ganglio dorsal, el cual contiene los cuerpos celulares de los nervios sensoriales somáticos, en el cordón espinal dorsal, donde se localizan las terminales centrales de los nervios sensoriales somáticos y en los tejidos periféricos (Burks y col. 1985). Además de la SP se ha mostrado que otros neuropéptidos como el CGRP se ven alterados después del tratamiento con capsaicina. El contenido de CGRP-IL se redujo en un 70% en el corazón, mientras que en la parte dorsal del cordón espinal disminuyó en un 60% (Franco-Cereceda

y col, 1987). Los efectos de la administración de capsaicina a bajas dosis son diferentes cualitativa y cuantitativamente a los efectos que se observan cuando se administran dosis altas del fármaco. Las lesiones más consistentes provocadas por la administración de la capsaicina son aquellas que se realizan de manera sistémica a ratas recién nacidas: una dosis única de 50 mg/kg de capsaicina, da como resultado la pérdida permanente, por degeneración, de las fibras aferentes no mielinizadas; sin cambios significativos en las fibras mielinizadas. Sin embargo, con dosis mayores de 50 mg/kg se observa reducción en el número de las fibras mielinizadas pequeñas (de tipo A) (Holzer, 1991). Es conveniente resaltar que no toda la SP contenida en los nervios sensoriales es sensible a la capsaicina, pues aun después del tratamiento con capsaicina permanecen pequeñas cantidades de SP inmunoreactiva (Holzer, 1988).

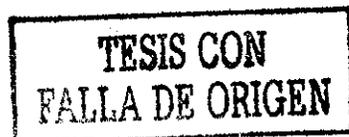
Mecanismo de acción de la capsaicina

Las principales características de los efectos de la capsaicina en las neuronas sensoriales delgadas son: excitación, desensibilización y neurotoxicidad.

Excitación.

Cuando los agonistas a capsaicina se unen al canal catiónico, se abre el poro y se produce el flujo catiónico, predominantemente de Ca^{2+} . Este flujo de cationes causa despolarización de la membrana. Cuando la despolarización de la membrana llega al umbral, se genera un potencia de acción que se propaga a lo largo de la neurona y puede ser percibida en el SNC como comezón o dolor. No se conoce con exactitud cómo la información de dolor de las terminales centrales de las neuronas sensibles a vainilloides es transmitida a las neuronas de segundo orden del cuerno dorsal. Las neuronas sensibles a vainilloides usan como neurotransmisores al glutamato, ATP y varios neuropéptidos.

La capsaicina induce la liberación de neuropéptidos pro-inflamatorios de las terminales nerviosas sensibles, los que inician la cascada de inflamación. Los neuropéptidos más estudiados son la SP y el CGRP. La SP interactúa



principalmente con el receptor NK-1 (NK-1R), y la estimulación de este receptor en células endoteliales induce una extravasación de plasma (formación de edema). Dependiendo de su localización, en las vías respiratorias el estímulo de los receptores NK-1R puede provocar tanto bronco-dilatación como bronco-constricción. La SP puede estimular las células mioepiteliales en las glándulas submucosas para producir moco y activar a los macrófagos alveolares. Finalmente, la SP tiene la capacidad de estimular los neutrófilos y los linfocitos T, aunque estas acciones probablemente no son mediadas por el NK-1R. La hiperalgesia posterior a la administración de capsaicina induce la liberación de óxido nítrico (NO), el cual provoca la liberación de glutamato de las terminales centrales de las neuronas sensibles a capsaicina lo que estimula el proceso nociceptivo.

Insensibilidad.

La excitación de las neuronas por capsaicina es seguida por un estado refractario en el cual las neuronas no responden al mismo estímulo y son resistentes a varios estímulos endógenos o exógenos. La insensibilidad de los receptores a vainilloides (VRs) probablemente refleja un cambio conformacional en las proteínas del receptor, inducido por los agonistas, el cual provoca que el canal se cierre. A continuación en un proceso denominado taquifilaxis, el VRs cicla entre estado cerrado y abierto por medio de numerosos estados intermedios de conductividad nula. La inactividad de la función neuronal después de la administración de capsaicina, puede deberse a que la capsaicina bloquea la conductancia de los axones y detiene el transporte intrazonal de las moléculas. El bloqueo de flujo axonal centrípeto puede privar al soma del NGF (factor de crecimiento neural, por sus siglas en inglés) (Miller y col 1982) lo que implica que en ausencia del factor de supervivencia, las neuronas del ganglio de la raíz dorsal no sólo pierden capacidad para responder a la capsaicina, sino también para realizar la síntesis de neuropéptidos. Si el flujo axonal centrípeto no está funcionando, ningún neuropéptido o agonista vainilloide puede ser transportado desde el soma a la terminal. Este efecto se pierde aparentemente 24 horas

después de la administración de un agonista vainilloide (Szallasi y Blumberg, 1992), y es debido a reducción en la densidad del receptor

La regulación a la baja de los receptores a los vainilloides, como un mecanismo de insensibilidad a vainilloides a largo plazo es dependiente de la dosis. La pérdida del receptor puede ser reversible o irreversible, dependiendo del lugar en que se localicen las terminales periféricas y centrales de las neuronas sensibles, pues entre ambas existe una sensibilidad diferencial a las acciones de los vainilloides

Neurotoxicidad.

La neurotoxicidad inducida por capsaicina parece deberse a una combinación entre el daño mitocondrial ocasionado por el incremento intracelular de Ca^{2+} , el daño osmótico seguido a la formación intracelular de $NaCl$ (el Na^+ entra a través de canales operados por los vainilloides, mientras que el Cl^- entra pasivamente) y a una "degeneración Walleriana" la cual pudiera ser el resultado del bloqueo axonal ya mencionado. La deprivación del NGF también parece jugar un papel importante en la neurotoxicidad dado que la adición de NGF incrementa la supervivencia de las neuronas sensibles a la capsaicina (Szallasi 1994).

Este proceso da en la neurona sensorial cambios funcionales y degenerativos, los cuales explican los efectos a largo plazo de la acción de la capsaicina. La disminución en las concentraciones de péptidos y otros constituyentes de las neuronas sensoriales es probablemente una consecuencia de la acción neurotóxica de la capsaicina, pero esto no es la causa de la disfuncionalidad de la neurona. Si el soma de la neurona sensorial no degenera, la manifestación de la neurotoxicidad puede ser reversible de manera pausada, mientras que la degeneración del soma resulta en un efecto neurotóxico irreversible (Holzer, 1994)

RECEPTOR SENSORIAL. Morfológicamente la mayoría de los receptores viscerales son terminales nerviosas libres, las que responden a varios tipos de estímulos, a pesar que estructuralmente son iguales (Brodal 1996). No se conoce la localización exacta de Las terminales sensoriales que se encuentran inmersas en el ovario, pero se cree que están relacionadas con los vasos sanguíneos (Kumazawa, 1986).

Los estudios más recientes acerca del tipo de receptor sensorial encontrado en los órganos reproductivos muestran que éstos son polimodales, es decir que pueden responder a varios tipos de estímulo: mecánico, químico y térmico, lo que indicaría que son receptores no diferenciados. Presumiblemente estos receptores polimodales juegan un papel importante en la función nociceptiva y también en la regulación de la inervación autónoma, donde se sabe que ambos tipos de inervación proliferan en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso.

Por diferencias en la expresión del receptor a los vainilloides en el DRG y en el ganglio nodoso, varios autores (Caterina y col. 1997; Helliwell y col.1998, Szallasi y Blumberg 1999) han llegado a la conclusión de que existen isoformas del receptor. Dichas diferencias pudieran ser consistentes con el origen embrionario diferente de estos tejidos (Vogel, 1992). Una evidencia más que apoya dicha hipótesis, es el hecho de que los factores neurotróficos o de supervivencia que regulan la sensibilidad de las neuronas a la capsaicina son diferentes: en el DRG es el NGF y en las neuronas del ganglio nodoso es el factor neurotrófico derivado del cerebro (por sus siglas en inglés BDNF brain derived neurotrophic factor) (Winter, 1998, Winter y col 1988).

Algunas neuronas vagales cuyo soma se encuentra en el ganglio nodoso también coinciden con los criterios de ser sensibles a la capsaicina (Lundberg y Saria 1983), aunque tienen muy poco en común con las neuronas primarias aferentes (de hecho tienen origen embrionario diferente) (Dockray y Sharkey, 1986).

Además de las neuronas del ganglio de la raíz dorsal y del ganglio trigeminal (Szallasi y Blumberg 1994, 1999), una porción menor de neuronas del

ganglio nodoso también expresan receptor a capsaicina. La zona que se marca positiva para los receptores a capsaicina se presenta en el área postrema, que forma parte de la región del núcleo tracto solitario, representando el área terminal central de las neuronas sensoriales del nervio vago (Szallasi y col 1999) (Fig 3). Por pruebas inmunohistoquímicas se ha mostrado que en el nervio vago se almacena y libera SP, en cantidades considerablemente mayores que otros neurotransmisores como el VIP o la somatostatina (Gilbert y col. 1980).

RELACIÓN ENTRE LA INERVACIÓN SENSORIAL Y LA SIMPÁTICA.

Similar a lo que sucede en otros órganos inervados por fibras simpáticas, parasimpáticas o sensoriales, el NGF es producido en el ovario y transportado retrógradamente desde el botón terminal hasta el soma neuronal donde funciona como factor de supervivencia. El receptor de baja afinidad al NGF y a otras neurotrofinas se encuentra presente en el ovario de la rata desde la etapa fetal (Dissen y col. 1991).

El NGF es un factor de supervivencia de las neuronas simpáticas y aferentes primarias de diámetro pequeño (Crowley y col 1994). Existen evidencias de que este factor puede regular el tamaño y la complejidad de los sitios de unión en las terminales nerviosas sensibles, además de que regula el brote de axones sensoriales en zonas recién formadas (Diamond y col. 1987). El papel del NGF en el sistema sensorial del adulto aun no es claro, aunque al llegar a la madurez, no parece ser necesario para la supervivencia neural, hay evidencias que sugieren que este factor puede interactuar en los sistemas de señalización y transmisión del dolor (Lewin y Mendell. 1993).

Dado que tanto la inervación simpática como sensorial son dependientes del NGF y que aparentemente la disponibilidad del factor en los tejidos es limitada, la denervación quirúrgica o la administración de neurotóxicos específicos, modifica la disponibilidad del factor neural en la inervación que queda intacta (Schicho y col. 1998). Así, la denervación simpática provoca incremento en la densidad de las terminales nerviosas sensoriales en el sistema cardiovascular, el tracto urogenital y

los ganglios simpáticos (Aberdeen y col 1990) Por otra parte, cuando se realiza la denervación sensorial por la administración de capsaicina la hiper-inervación simpática se presenta en las arterias mesentéricas (Ralevic y col. 1995), el iris y la cavidad oral (Terenghi y col. 1986).

En la rata, ha sido bien documentado que el tratamiento neonatal con capsaicina resulta en una destrucción permanente de las fibras nerviosas primarias aferentes que contienen SP (Fitzgerald, 1983), por lo cual se cree que estas fibras modulan indirectamente la función de los órganos reproductores por medio de la liberación de SP como un neurotransmisor de sinapsis en neuronas autónomas (de tipo adrenérgico), como ha sido reportado por Gamse y col (1981).

Se ha postulado que la innervación sensorial y la simpática pudieran presentar un control funcional entre ambas... Terenghi y col. (1986) han mostrado que después de una simpatectomía local en los tejidos periféricos aumenta la cantidad de fibras inmunoreactivas a CGRP, mientras que las inmunoreactivas a tirosina hidroxilasa (TH) prácticamente desaparecen. De manera inversa, después del tratamiento con capsaicina se observa incremento de fibras nerviosas inmunoreactivas a TH acompañado de una disminución de nervios inmunoreactivos a CGRP.

En la rata neonatal, la desnervación con capsaicina, induce en el iris (área que presenta una abundante innervación de tipo sensorial, rica en SP), incremento en las concentraciones de NA en las terminales nerviosas simpáticas sin afectar la densidad de la terminal simpática. El incremento en las concentraciones de NA se asocia no sólo con una disminución en las concentraciones de SP, sino también de la pérdida de fibras inmunoreactivas a SP (Luthman y col. 1989)

Chung, y colaboradores (1985), han mostrado que en la rata adulta alrededor del 90% de los axones de la uretra llegan a degenerar después de la inyección sistémica de capsaicina, lo que sugiere que las fibras eferentes autonómicas también fueron afectadas. En determinados tejidos periféricos la pérdida de fibras sensoriales puede acarrear un incremento en la innervación

simpática; por ejemplo, Sann y col. (1995) mostraron que la capsaicina produce una degeneración selectiva de la mayoría de fibras aferentes en el plexo subepitelial de la uretra de la rata. La pérdida de nervios aferentes sensibles a la capsaicina provoca cambios neuroplásticos, que dan como resultado una hiperinervación por el neuropéptido Y (NPY), presumiblemente acarreado por fibras simpáticas. Estos resultados sugieren una regulación mutua de los patrones de distribución de la inervación, por las neuronas sensoriales y simpáticas, en tejidos periféricos.

En otro estudio realizado por Ralevic y col. (1995) quienes inducen en la rata neonatal desnervación sensorial con capsaicina, muestran cambios tróficos en las arterias mesentéricas, lo que se evidencia por un incremento en la vasoconstricción simpática mediada por la unión presináptica (incremento de NA en el tejido) y de la unión post-sináptica (incremento en la respuesta a NA y 5-HT).

Se cree que la existencia de influencias tróficas entre los dos tipos de inervación en órganos periféricos sea por intermedio de sustancias neurotróficas como el NGF. En la cobaya, el tratamiento sistémico con capsaicina disminuye la cantidad de NGF marcado que es transportado a través de la vía neural retrógrada, desde la yemas de la pata del animal al nervio sensorial correspondiente del DRG. Es importante resaltar que la disminución del transporte de NGF ocurre antes de la disminución de SP en el ganglio de la raíz dorsal; y que la administración de NGF previene de manera total la disminución de la concentración de SP provocada por la capsaicina (Burks y col. 1985). La disminución de la SP se puede deber en parte a la incapacidad de los nervios para transportar factores neurotróficos necesarios para el mantenimiento de la síntesis de SP en los cuerpos celulares nerviosos

DESARROLLO FOLICULAR E INERVACIÓN.

Malamed y col (1992) han mostrado en la rata que el inicio del crecimiento folicular es un evento que toma lugar sólo poco después del nacimiento. Aunque son muy pocos los folículos que pueden verse en el ovario a las 24 horas de vida,

se da un marcado incremento en las siguientes 24 horas. Varios reportes coinciden en que no hay receptores a las gonadotropinas en los ovarios de ratas muy jóvenes de 4-5 días de edad, ya que ni la administración de PMSG o FSH ni la inmunoneutralización de las gonadotropinas endógenas, son capaces de alterar el número de folículos que comienzan a crecer durante los primeros días de vida (Peters, 1979; Lunenfeld y col. 1975). Sin embargo, sí existen fibras nerviosas; por lo que diversos autores sugieren que la inervación del ovario pudiera contribuir a que los folículos adquieran receptores a gonadotropinas y de esta manera modular el desarrollo de los mismos (Dissen y col. 1992).

Durante los tres primeros días de vida de la rata, en el ovario existen tres tipos celulares: células germinales, células mesenquimáticas y células epiteliales. Las células germinales migran dentro de la gónada primitiva y son rodeados por células epiteliales de la *rete* ovárica, la cual es derivada de los túbulos mesonéfricos; y es este tipo celular el que va a dar origen a las células de la granulosa. Posteriormente las células mesenquimáticas rodean a los ovocitos los que a su vez están rodeados por una capa sencilla de células de la pregranulosa, formándose así los folículos.

Mucho antes de la formación de los primeros folículos, las células mesenquimáticas contienen una clase de receptor a neurotropinas conocida como p75, que es el receptor de baja afinidad para el NGF, dicho receptor tiene la capacidad de reconocer a todos los miembros de la familia de las neurotropinas a las que pertenece el NGF. La adición de anticuerpos al NGF a ovarios neonatales *in vitro* causa la muerte de células mesenquimáticas muy extendida, lo que previene la formación de folículos (Funkeinstein y col. 1980).

Independientemente del efecto de las gonadotropinas sobre la foliculogénesis, es bien conocido que la esteroidogénesis en esta etapa es independiente de las gonadotropinas. Los ovarios en cultivo a los que se les agrega gonadotropinas no responden con un incremento en la actividad de las aromatasas. La adición de AMPc o la activación del sistema de la adenilato ciclasa

con "forskolin" induce un incremento en la actividad de las enzimas, sugiriendo que otro mensajero aparte de la FSH o LH puede operar dentro del ovario antes de que se haya iniciado el crecimiento folicular. La identidad del mensajero no es clara, pero es importante hacer notar que el ovario contiene VIP, el cual está presente desde antes de la formación de los folículos, y el cual tiene la capacidad de estimular la producción de AMPc y de aromatasas en los ovarios de animales fetales (Ahmed y col. 1986; George y Ojeda 1987).

En el ovario, la foliculogénesis se inicia cerca de la médula, región que contiene la mayor parte de la inervación. Inclusive en algunas especies de mamíferos, incluyendo a la rata Wistar y algunos primates, se describieron la presencia de neuronas a este nivel (D'Albora y col 2000).

Una vez que ha ocurrido la foliculogénesis, el proceso de crecimiento folicular, posterior a la primera semana de vida, es un fenómeno dependiente de las gonadotropinas, y el mantenimiento del desarrollo folicular depende de la presencia constante de dichas hormonas, lo que coincide con el establecimiento del circuito de retroalimentación entre el ovario y el SNC a los diez días de vida (Ojeda y Urbanski 1994).

Durante la etapa infantil, la producción de esteroides ováricos incrementa marcadamente y la FSH es capaz de inducir la actividad de las aromatasas. Adicionalmente, el ovario muestra la capacidad de responder al incremento endógeno de gonadotropinas con liberación de esteroides. Durante la segunda semana de vida postnatal el desarrollo de los folículos está sujeto a un fuerte control hormonal y la mayoría de los folículos que comienzan a moverse a un estado de mayor desarrollo es el doble de aquellos en estados posteriores (Hirshfield 1994).

Durante la etapa juvenil el ovario crece bajo la influencia de concentraciones bajas de FSH y LH. Durante este tiempo en el ovario se observan oleadas de crecimiento folicular y atresia, y la respuesta del ovario a las gonadotropinas se debe al incremento en el número de sus receptores y además a

la prolactina y a la hormona del crecimiento.

Cuando se elimina parcialmente la inervación simpática y sensorial del ovario por la administración de anticuerpos al NGF (abNGF), se produce una disminución en la producción de andrógenos y estradiol, retraso en la edad de la primera ovulación y alteraciones subsecuentes en el ciclo estral. Los autores explican estos fenómenos como un efecto directo de la ausencia de NGF, sin considerar la posibilidad de que existan efectos importantes sobre el SNC. El NGF parece jugar un papel esencial en el desarrollo de la inervación simpática y sensorial del ovario; la cual es importante para la adquisición y mantenimiento de las funciones del órgano (Lara y col. 1990b).

Estos mismos autores han reportado que cuando se elimina la inervación catecolaminérgica por la administración de guanetidina (GTD), se provoca una marcada acumulación de folículos antrales pequeños y una disminución en la cantidad de folículos preantrales (Lara y col. 1990a).

En estos dos modelos de desnervación (GTD y abNGF) se observa una acumulación de folículos antrales pequeños. La diferencia entre ambos modelos es que *mientras la desnervación con GTD provoca disminución en el número de folículos preantrales, el tratamiento con abNGF induce aumento de este tipo folicular*. Los autores sugieren que la administración de GTD no provoca alteraciones en la inervación sensorial, mientras que el abNGF sí. Al parecer la inervación sensorial actuaría para que se de una comunicación intrafolicular, ya que la acumulación de folículos pequeños antrales inhibiría la formación de folículos preantrales (Lara y col. 1990ab).



PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El sistema nervioso central regula las funciones del ovario por una vía neurohormonal y otra neural. La segunda involucra uniones directas a través de los nervios periféricos con el ovario, incluyendo la inervación simpática y la parasimpática (Burden, 1985; Morales y col 1993; Ojeda y Urbanski, 1994; Morales y col 1998; Morán y col 2000a). La administración de capsaicina a los 3 días de edad no modifica la edad de apertura vaginal (Razo, 2000), mientras que la denervación a los dos días de vida, induce retraso en el inicio de la pubertad y disminución en la fertilidad de los animales adultos (Traurig y col, 1984; 1988), por lo que los autores proponen que la inervación sensorial conecta a los órganos reproductivos con el sistema nervioso central (Traurig y col, 1984; Burden y col, 1983a), y que éste tipo de inervación participa en la regulación del desarrollo del folículo ovárico (Domínguez y Riboni 1971; Lara y col. 1990a)

Con base en estos antecedentes, decidimos analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre la pubertad y los mecanismos involucrados en el desarrollo del ovario en edades previas. Además, ya que se ha mostrado que en diversos órganos periféricos coexisten la inervación simpática y la sensorial y que pueden tener efectos sinérgicos, es decir, en el caso de que falte alguna de las dos vías la restante pueda incrementar sus funciones, también se analizó si ante la falta de la información sensorial, desde la etapa neonatal, se produce aumento de la sensibilidad del sistema catecolaminérgico del ovario en la rata juvenil y púber.

HIPÓTESIS

Dado que las funciones ováricas son reguladas por el sistema nervioso central, el cual recibe información sobre el funcionamiento de las gónadas vía la inervación sensorial, la eliminación de estas vías desde el nacimiento debe inducir enlentecimiento en el crecimiento folicular y en la capacidad de síntesis de las hormonas esteroides, así como un retraso en el inicio de la pubertad.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación de la inervación sensorial en el inicio de la pubertad y en el crecimiento del folículo ovárico a diferentes edades del periodo juvenil

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre los mecanismos involucrados en la edad de la apertura vaginal y la primera ovulación espontánea.
- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico a lo largo de la etapa juvenil y al primer estro vaginal.
- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre la ovulación inducida por el tratamiento con gonadotropinas.
- Estudiar los efectos de la denervación sensorial, por la administración de capsaicina, sobre la concentración de catecolaminas ováricas, a lo largo de la etapa juvenil y al primer estro vaginal.

HIPÓTESIS

Dado que las funciones ováricas son reguladas por el sistema nervioso central, el cual recibe información sobre el funcionamiento de las gónadas vía la inervación sensorial, la eliminación de estas vías desde el nacimiento debe inducir enlentecimiento en el crecimiento folicular y en la capacidad de síntesis de las hormonas esteroides, así como un retraso en el inicio de la pubertad.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación de la inervación sensorial en el inicio de la pubertad y en el crecimiento del folículo ovárico a diferentes edades del periodo juvenil

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre los mecanismos involucrados en la edad de la apertura vaginal y la primera ovulación espontánea.
- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico a lo largo de la etapa juvenil y al primer estro vaginal.
- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre la ovulación inducida por el tratamiento con gonadotropinas.
- Estudiar los efectos de la denervación sensorial, por la administración de capsaicina, sobre la concentración de catecolaminas ováricas, a lo largo de la etapa juvenil y al primer estro vaginal.

HIPÓTESIS

Dado que las funciones ováricas son reguladas por el sistema nervioso central, el cual recibe información sobre el funcionamiento de las gónadas vía la inervación sensorial, la eliminación de estas vías desde el nacimiento debe inducir enlentecimiento en el crecimiento folicular y en la capacidad de síntesis de las hormonas esteroides, así como un retraso en el inicio de la pubertad.

OBJETIVO GENERAL

Analizar la participación de la inervación sensorial en el inicio de la pubertad y en el crecimiento del folículo ovárico a diferentes edades del periodo juvenil

OBJETIVOS PARTICULARES

- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre los mecanismos involucrados en la edad de la apertura vaginal y la primera ovulación espontánea.
- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico a lo largo de la etapa juvenil y al primer estro vaginal.
- Analizar el efecto de la administración de capsaicina al nacimiento sobre la ovulación inducida por el tratamiento con gonadotropinas.
- Estudiar los efectos de la denervación sensorial, por la administración de capsaicina, sobre la concentración de catecolaminas ováricas, a lo largo de la etapa juvenil y al primer estro vaginal.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas adultas vírgenes de la cepa CII-ZV de tres meses de edad, mantenidas en condiciones controladas de luz-obscuridad (14h luz, 10h oscuridad) y con libre acceso al agua y al alimento. En el día del proestro las hembras se colocaron con un macho de fertilidad comprobada. Previo al parto, las hembras preñadas fueron separadas en cajas individuales. Al nacimiento, las crías fueron separadas por camadas de cinco hembras y un macho. Los animales se destetaron al día 21 de vida.

Los animales se separaron en los siguientes grupos experimentales:

- Grupos de ratas tratadas con capsaicina.
- Grupos de animales tratados con el vehículo de la capsaicina.
- Grupos de ratas sin tratamiento que sirvieron como testigo absoluto.

Los animales de los diferentes grupos experimentales se pesaron una vez por semana para determinar el patrón de crecimiento corporal.

TRATAMIENTO FARMACOLÓGICO: El día del nacimiento, las ratas se pesaron e inyectaron subcutáneamente con 50 mg/kg de peso corporal de capsaicina y regresadas a la camada. La capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida) (Sigma Chemical Company, St. Louis, Mo. USA) fue disuelta en una solución con 10% de etanol, 10% de Tween 80 y 80% de solución salina. La dosis de 50 mg/kg de capsaicina estuvo contenida en un volumen de 0.01 ml por cada gramo del animal.

El grupo tratado con vehículo, fue inyectado con la solución en la que se disuelve la capsaicina. Las inyecciones de los fármacos se aplicaron entre las 9:00 y 11:00 hrs.

Los ovarios de tres animales de cada grupo experimental fueron incluidos en solución de Bouin, deshidratados en alcoholes graduados, incluidos en parafina y cortados de manera seriada a 10 μ m de grosor para su posterior tinción con la técnica de hematoxilina-eosina. En los corte se realizó el análisis morfométrico con la ayuda de un ocular micrométrico, y se determinó el diámetro folicular. También

se evaluó si los folículos eran sanos o atrésicos. Se consideró como folículo atrésico aquel que presentó al menos una de las siguientes características:

- Picnosis nuclear de las células de la granulosa
- Descamación de las células de la granulosa
- Engrosamiento de las capas celulares de la teca
- Alteraciones del ovocito

Los ovarios de cinco animales tratados con capsaicina, con el vehículo o sin tratamiento se disecaron en frío y se almacenaron a -70°C hasta la cuantificación de noradrenalina por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC)

Se colectó la sangre del tronco, la cual se dejó coagular a 4°C por 30 minutos y posteriormente se centrifugó a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. Se separó el suero y se almacenó a -20°C . Los sueros fueron utilizados para la determinación de 17β -estradiol y progesterona por radioinmunoanálisis (RIA).

EXPERIMENTO 1. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA ADMINISTRACIÓN DE CAPSAICINA AL NACIMIENTO SOBRE LA PUBERTAD, LA OVULACIÓN, LA ESTEROIDOGÉNESIS Y EL CRECIMIENTO FOLICULAR.

Las ratas denervadas y los animales inyectados con vehículo o sin tratamiento, fueron revisadas diariamente a partir de los 30 días de edad para determinar la edad de la apertura vaginal y del primer estro, a través de toma de frotis vaginal. Al día del primer estro, los animales fueron sacrificados por decapitación para obtener el suero; a la autopsia se extrajeron los ovarios y el útero, los cuales fueron pesados en una balanza de precisión al 0.1 mg. Las trompas se revisaron para determinar la presencia de ovocitos, los cuales fueron contados con un microscopio estereoscópico.

EXPERIMENTO 2. ESTUDIO DEL EFECTO DE LA CAPSAICINA EN LA ETAPA NEONATAL SOBRE LA OVULACIÓN INDUCIDA EN LA RATA JUVENIL.

Dado que la respuesta ovulatoria disminuyó después del tratamiento con capsaicina, y conociendo que en los roedores la PMSG y la hCG estimulan el crecimiento y la diferenciación de los folículos ováricos de manera semejante a lo que hace la FSH y la LH, en éste experimento se analizó si la administración de capsaicina en la etapa neonatal de la rata afecta la capacidad de respuesta del ovario a un estímulo similar al de las gonadotropinas

Las ratas denervadas y los animales inyectados con vehículo o sin tratamiento fueron inyectadas s.c. con 8 u.i. de PMSG a los 27 días de edad. Los animales fueron sacrificados el día del estro vaginal. A la autopsia se extrajeron los ovarios y el útero, los que fueron pesados en una balanza analítica. En las trompas ováricas se contó el número de ovocitos liberados.

En un estudio paralelo, las ratas denervadas y los animales inyectados con vehículo o sin tratamiento fueron inyectadas s.c. con 8 u.i. de PMSG a los 27 días de edad y con 10 u.i. de hCG a las 48 horas. Los animales fueron sacrificados al día del estro vaginal y se autopsiaron como en el grupo anterior.

EXPERIMENTO 3. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA DENERVACIÓN SENSORIAL EN LA TASA DE FERTILIDAD DE LA RATA HEMBRA ADULTA.

A los tres meses de edad, en el día del proestro vaginal, las ratas denervadas y los animales inyectados con vehículo o sin tratamiento fueron colocadas con machos de fertilidad comprobada. Los animales fueron revisados diariamente hasta comprobar la presencia de tapón espermático en la vagina y espermatozoides en el frotis vaginal. A partir de ese momento los animales fueron separados en cajas individuales hasta la fecha de parición.

EXPERIMENTO 4. ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE LA DENERVACIÓN SENSORIAL SOBRE EL DESARROLLO Y DIFERENCIACIÓN DEL FOLÍCULO OVÁRICO, LA ESTEROIDOGÉNESIS Y LA CONCENTRACIÓN DE NORADRENALINA OVÁRICA EN LA RATA A DIFERENTES EDADES DEL PERIODO JUVENIL.

Grupos de las ratas denervadas y los animales inyectados con vehículo o sin tratamiento fueron sacrificadas por decapitación a los 20, 24, 28 y 32 días de edad. Se extrajo el suero, los ovarios y el útero. Los órganos se pesaron con la ayuda de una balanza analítica. Se realizó el análisis morfométrico de la manera en que ya se describió en la metodología general y la cuantificación de catecolaminas ováricas y esteroides en suero.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

El peso de los ovarios y del útero, las concentraciones de NA, las de estradiol y progesterona se analizaron por una prueba de análisis de varianza multifactorial (ANDEVA), seguida por la prueba de Tukey. La tasa de animales preñados y la de ovulantes, definida como el número de animales ovulantes/número total de animales se analizó por la prueba de probabilidad exacta de Fisher o de Ji cuadrada. En todos los casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas aquellas cuya probabilidad fue igual o menor a 0.05.



RESULTADOS

Experimento 1. Estudio de los efectos de la administración sistémica de capsaicina al nacimiento sobre la pubertad, la ovulación, la esteroidogénesis y el crecimiento folicular.

Las ratas tratadas con capsaicina presentaron retraso en la edad de la apertura vaginal. Al momento de la apertura vaginal, aproximadamente el 70% de los animales testigo absoluto y de los inyectados con el vehículo presentaron estro vaginal. El resto de los animales tarda alrededor de dos días en presentarlo. Sólo el 35% de los animales denervados al nacimiento, tuvieron estro vaginal al momento de la apertura vaginal y el resto presentó características de diestro o de diestro-proestro; y el primer estro se encontró 5-6 días después. Como consecuencia de este retraso los animales al momento de presentar el estro, son más grandes y pesan más (Tabla 1).

La mayoría de los animales inyectados con vehículo o con capsaicina ovularon el día del primer estro (Tabla 1). El número de ovocitos liberados por los animales denervados fue menor que el del grupo testigo absoluto o de los inyectados con vehículo (Tabla 2).

Tomando en consideración que los animales denervados pesaron más al momento del primer estro vaginal, el peso de los ovarios y del útero se expresó en función del peso de los animales. El peso de los ovarios de los animales denervados fue significativamente mayor al de los animales inyectados con el vehículo, mientras que no se modificó el peso del útero (Tabla 2).

En las hembras denervadas al nacimiento, la concentración de progesterona y estradiol fue similar a la de los animales testigos absolutos e inyectados con vehículo (Tabla 2).

Tabla 1. Media \pm eem del **peso corporal**, de la edad de la apertura vaginal (**EAV**), edad del primer estro (**PEV**) y **tasa ovulatoria** (número de animales ovulantes/ número de animales tratados X100) en animales testigo absoluto o tratados al nacimiento con vehículo o capsaicina. Los animales fueron autopsiados el día del primer estro vaginal.

Grupos	n	Peso corporal (g)	EAV (días)	PEV (días)	Tasa (%) ovulatoria
Testigo Absoluto	10	114.6 \pm 3.7	36.5 \pm 0.2	38.0 \pm 0.5	94
Vehículo	11	109.8 \pm 2.9	37.1 \pm 0.2	38.5 \pm 0.4	95
Capsaicina	22	133.3 \pm 3.8*†	40.5 \pm 0.4 *†	45.7 \pm 0.9 *†	83.5

* P<0.05 vs. Vehículo (Kruskal Wallis).

† P<0.05 vs testigo absoluto (Kruskal Wallis).

Tabla 2. Media \pm eem. del número de **ovocitos** liberados, **peso de los ovarios** y **del útero** (mg/100g de peso corporal), **concentraciones séricas de estradiol y progesterona** en animales testigo absoluto o tratados al nacimiento con vehículo o con capsaicina. Los animales fueron autopsiados el día del primer estro vaginal.

Grupos	Número de ovocitos liberados	Peso de ovarios	Peso del útero	estradiol (pg/ml)	progesterona (ng/ml)
Testigo absoluto	8.2 \pm 0.3	32.2 \pm 1.3	144.9 \pm 5.2	22.1 \pm 1.5	4.2 \pm 1.7
Vehículo	9.0 \pm 0.3	29.2 \pm 1.4	140.1 \pm 4.6	29.4 \pm 3.4	5.7 \pm 2.5
Capsaicina	6.4 \pm 0.4 *†	36.8 \pm 1.4 *	152.1 \pm 6.8	33.3 \pm 7.8	6.1 \pm 2.5

* P<0.05 vs. vehículo (Kruskal Wallis o ANDEVA seguida de Tukey).

† P<0.05 vs. testigo absoluto (Kruskal Wallis seguida por U de Mann Witney)

Efectos de la denervación sensorial sobre el desarrollo y diferenciación del folículo ovárico de la rata púber.

No existieron diferencias significativas entre el número de folículos contados en el ovario izquierdo y el derecho en cada uno de los grupos estudiados (Fig. 1) ni cuando estos son analizados por rango (Figs 2a y b).

El número total de folículos contados en los ovarios de los animales tratados con capsaicina fue significativamente menor que en los inyectados con vehículo

(Fig. 1). La misma tendencia se presentó cuando los folículos son analizados por rango (Figs. 2 a y b).

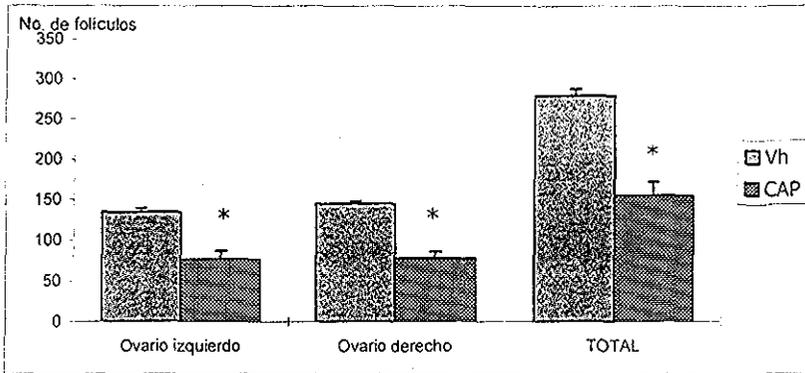


Fig. 1. Media±eem del número total de folículos contados en el ovario izquierdo y derecho de animales inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados el día del primer estro vaginal. * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la U de Mann Witney).

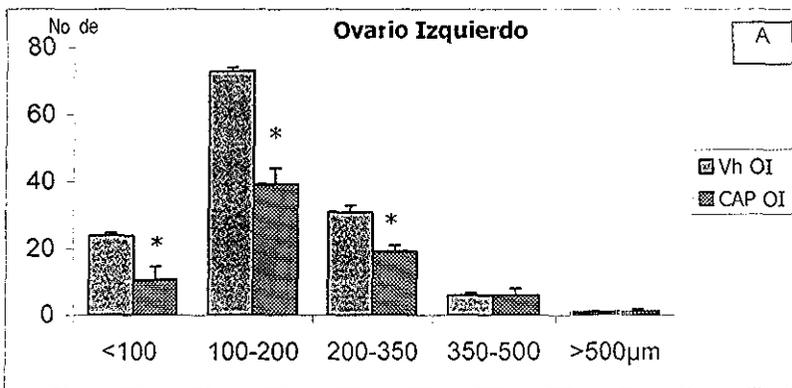


Fig. 2A. Media±eem del número total de folículos por rangos en los ovarios de animales inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados el día del primer estro vaginal. * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la U de Mann Witney).

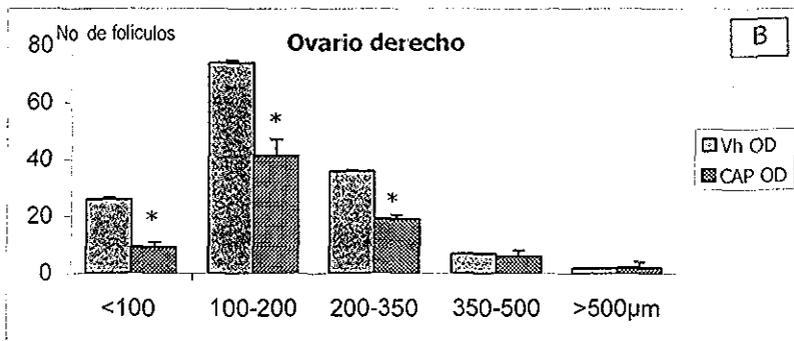


Fig. 2B. Media±eem del número total de folículos por rangos en los ovarios de animales inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados el día del primer estro vaginal. * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la U de Mann Witney).

Dado que no se observaron diferencias en el patrón de crecimiento y diferenciación folicular, entre el ovario izquierdo y derecho de los animales inyectados al nacimiento con el vehículo o la capsaicina, en adelante los resultados serán expresados como el promedio de seis ovarios por grupo.

El número de folículos sanos disminuyó en los ovarios de los animales tratados con capsaicina (Fig. 3), la proporción de folículos atrésicos en los animales denervados fue significativamente mayor que en los inyectados con vehículo (60% en los inyectados con capsaicina vs. 33% en los animales inyectados con vehículo $P < 0.01$)

Como ya se mencionó, la denervación con capsaicina indujo disminución en los folículos $< 350 \mu\text{m}$ de diámetro (Fig 2 a y b), que corresponde a folículos sanos (Fig. 4), mientras que no hubo cambios en los atrésicos (Fig. 5)

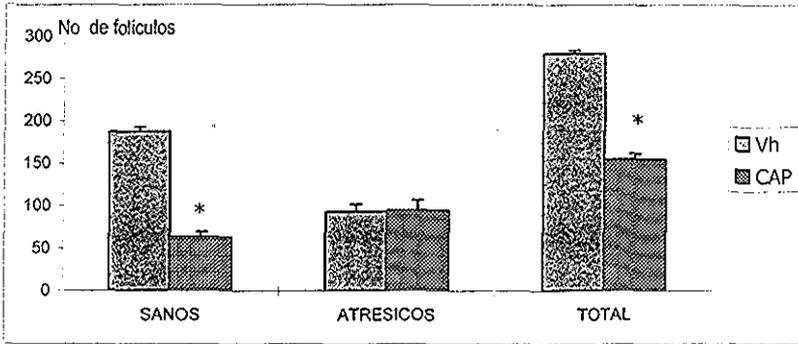


Fig. 3. Media \pm em del número total de folículos sanos o atresicos en los ovarios de animales inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados el día del primer estro vaginal. * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la U de Mann Witney).

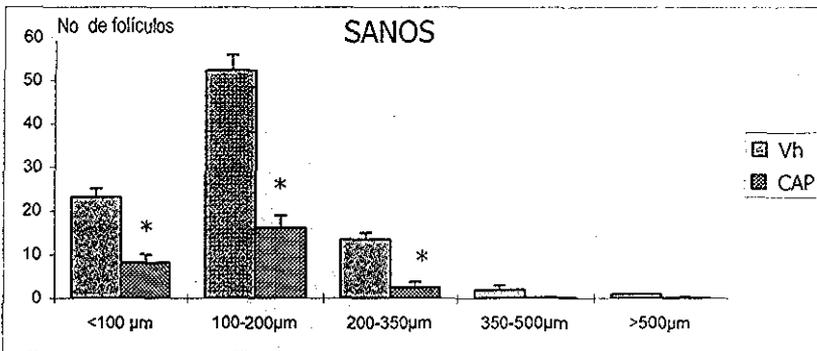


Fig. 4. Media \pm em del número de **folículos sanos** clasificados por rangos en los ovarios de animales inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados el día del primer estro vaginal. * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la U de Mann Witney).

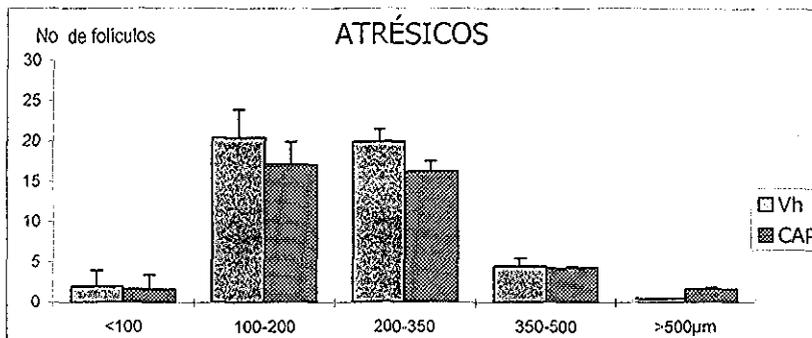


Fig. 5. Media±eem del número de **folículos atrésicos** clasificados por rangos en los ovarios de animales inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados el día del primer estro vaginal.

Experimento 2. Estudio del efecto de la capsaicina en la etapa neonatal sobre la ovulación inducida en la rata juvenil.

La inyección de PMSG o PMSG-hCG indujo la ovulación en los animales denervados, pero el número de ovocitos liberados fue significativamente menor al de los animales testigo absoluto o a los tratados con el vehículo (Tabla 3).

Tabla 3. Media ± eem. del **número de ovocitos** liberados en animales testigo absoluto o tratadas al nacimiento con vehículo o capsaicina. Los animales fueron estimulados a los 27 días de edad con 8 u.i. de PMSG o con 8 i.u. de PMSG seguidos de 10 u.i. de hCG a las 54 horas. Los animales fueron autopsiados en día del primer estro vaginal.

Grupos	n	PMSG	n	PMSG-hCG
Testigo absoluto	6	15.2±1.5	8	18.0±0.9
Vehículo	5	15.3±1.8	8	17.5±1.4
Capsaicina	5	10.0±0.8 * †	8	11.5±1.3 * †

* P<0.05 vs. vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la U de Mann Witney).

† P<0.05 vs. Testigo absoluto (Kruskal Wallis, seguida por la U de Mann Witney).

Experimento 3. Estudio de los efectos de la denervación sensorial en la tasa de fertilidad de la rata hembra adulta.

Todos los animales denervados copulan y presentan espermias en la vagina. El número de ratas preñadas en los animales denervados al nacimiento fue significativamente menor comparado con los animales testigo y tratados con el vehículo.

Tabla 4. Número de animales con esperma positivo y de ratas preñadas en el grupo testigo o tratado con capsaicina al nacimiento.

Combinaciones de apareamiento	n	hembras con esperma	hembras preñadas
Hembra testigo /macho testigo	6	6/6	6/6
Hembra capsaicina /macho testigo	15	15/15	3/15*

* $p < 0.05$ Prueba exacta de Fisher

Experimento 4. Estudio de los efectos de la denervación sensorial sobre el desarrollo y diferenciación del folículo ovárico, la esteroidogénesis y la concentración de noradrenalina ovárica en la rata a diferentes edades del periodo juvenil.

A los 20 días de edad el peso corporal de los animales inyectados con el vehículo fue significativamente mayor que el grupo testigo absoluto, diferencias que no se observaron en los animales de 24, 28 y 32 días de edad. Los animales denervados de 32 días de edad presentaron un menor peso corporal que las ratas testigo absoluto e inyectados con vehículo (Tabla 5).

Tabla 5. Media \pm eem. del **peso corporal** en animales testigo, inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad.

Grupos	n	20 días	24 días	28 días	32 días
Testigo absoluto	8	41.3 \pm 0.4	60.8 \pm 0.9	69.2 \pm 2.11	89.4 \pm 0.7
Vehículo	8	48.0 \pm 2.7 †	56.8 \pm 1.5	65.5 \pm 2.47	90.0 \pm 2.2
Capsaicina	10	40.1 \pm 0.9 *	58.6 \pm 1.8	61.6 \pm 3.7	77.6 \pm 2.6 *†

* P<0.05 vs. vehículo (ANDEVA seguida de Tukey).

†P<0.05 vs. TA (ANDEVA seguida de Tukey).

El peso de los ovarios de los animales denervados y sacrificados a los 32 días de edad fue significativamente menor que el de los animales testigo o inyectados con el vehículo, sin cambios en las demás edades (Tabla 6). El peso del útero de los animales denervados y sacrificados a los 32 días de edad se comportó de la misma manera (Tabla 7)

Tabla 6. Media \pm eem. de la masa ovárica (mg) en animales control, tratados con capsaicina o con el vehículo de la capsaicina. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad.

Grupos	20 días	24 días	28 días	32 días
Testigo absoluto	19.9 \pm 0.4	23.9 \pm 1.6	28.7 \pm 2.4	30.6 \pm 2.8
Vehículo	16.8 \pm 2.4	19.1 \pm 0.8	25.5 \pm 1.5	25.6 \pm 1.8
capsaicina	18.8 \pm 2.6	20.2 \pm 1.5	24.7 \pm 1.6	22.6 \pm 1.6 †

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

† P<0.05 vs Testigo absoluto (ANDEVA seguida de Tukey).

Tabla 7. Media \pm eem. del peso del útero (mg) en animales control, tratados con capsaicina o con el vehículo de la capsaicina en la etapa neonatal. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad.

Grupos	20 días	24 días	28 días	32 días
Testigo absoluto	31.1 \pm 2.1	35.8 \pm 2.3	50.8 \pm 4.0	73.7 \pm 13.8
Vehículo	38.2 \pm 2.1	40.4 \pm 2.3	42.3 \pm 2.3	82.3 \pm 7.9
capsaicina	33.6 \pm 2.1	40.4 \pm 3.7	50.9 \pm 2.8	45.1 \pm 3.5 *†

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

† P<0.05 vs Testigo absoluto (ANDEVA seguida de Tukey).

En los animales denervados sacrificados a los 28 días de edad la concentración sérica de estradiol fue menor que en ambos grupos testigo. La concentración de progesterona en los animales denervados fue menor en las cuatro edades estudiadas (Tabla 8)

Tabla 8. Media \pm eem. de la concentración en suero de **estradiol y progesterona** en animales control o tratados con capsaicina o vehículo al nacimiento. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad.

Grupos	20 días	24 días	28 días	32 días
Estradiol (pg/ml)				
Testigo absoluto	22.4 \pm 3.2	31.6 \pm 6.8	20.7 \pm 2.3	16.5 \pm 4.7
Vehículo	20.9 \pm 3.9	16.0 \pm 1.6	22.1 \pm 2.4	23.7 \pm 2.6
Capsaicina	24.4 \pm 8.5	21.7 \pm 3.6	13.6 \pm 1.1 *†	21.9 \pm 2.6
Progesterona (ng/ml)				
Testigo absoluto	6.6 \pm 1.4	10.9 \pm 0.4	10.7 \pm 2.3	12.8 \pm 1.8
Vehículo	6.8 \pm 1.3	10.6 \pm 0.1	12.7 \pm 2.4	12.5 \pm 2.3
Capsaicina	3.2 \pm 1.0	6.5 \pm 1.1 *†	4.1 \pm 1.5 *†	2.3 \pm 0.5 *†

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

† P<0.05 vs Testigo absoluto (ANDEVA seguida de Tukey)

La concentración de noradrenalina fue significativamente mayor en los ovarios de los animales denervados y sacrificados a los 24 días de edad (Tabla 9).

Tabla 9. Media \pm eem. de la concentración de **noradrenalina** (ng/mg de tejido) en el ovario de animales testigo o tratados al nacimiento con capsaicina o vehículo. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad.

	20 días	24 días	28 días	32 días
Testigo absoluto	0.45 \pm 0.03	0.61 \pm 0.05	1.0 \pm 0.04	1.09 \pm 0.06
Vehículo	0.48 \pm 0.08	0.73 \pm 0.07	0.90 \pm 0.08	1.08 \pm 0.12
capsaicina	0.44 \pm 0.03	0.87 \pm 0.07 *	0.80 \pm 0.07	1.2 \pm 0.09

* P<0.05 vs. vehículo (ANDEVA seguida de Tukey).

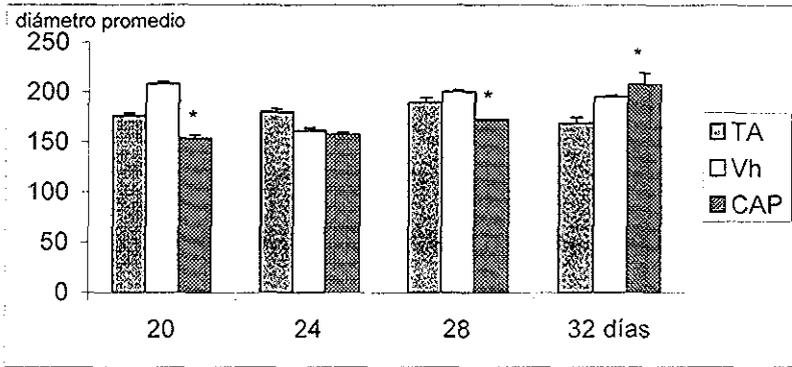


Fig. 6. Media±eem. del **diámetro folicular** promedio en el ovario izquierdo de animales testigo absoluto o inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades de la etapa infantil-juvenil. * $p < 0.05$ vs. vehículo o testigo absoluto (Kruskal Wallis, seguida por la prueba de U de Mann Whitney).

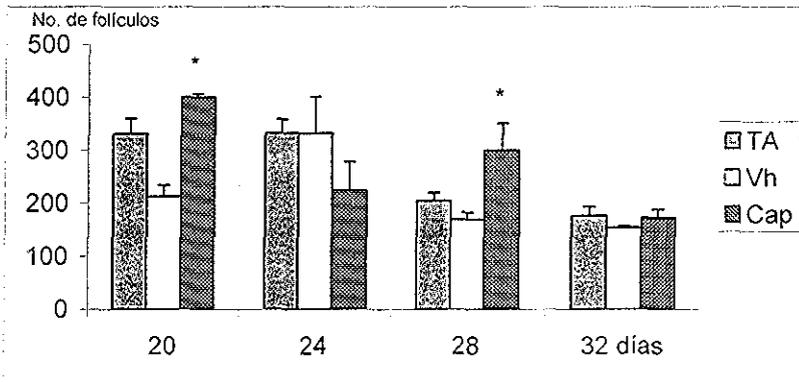


Fig. 7. Media±eem. del **número total de folículos** (sanos más atrésicos) en el ovario izquierdo de animales testigo absoluto o inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades de la etapa infantil-juvenil. * $p < 0.05$ vs. vehículo o testigo absoluto (Kruskal Wallis, seguida por la prueba de U de Mann Whitney).

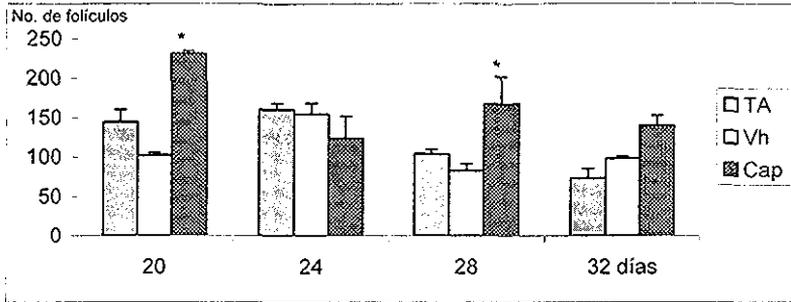


Fig. 8. Media±eem del número total de **folículos atrésicos** en el ovario izquierdo de animales testigo absoluto o inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades de la etapa infantil-juvenil. * $p < 0.05$ vs. Vehículo o testigo absoluto (Kruskal Wallis, seguida por la prueba de U de Mann Whitney).

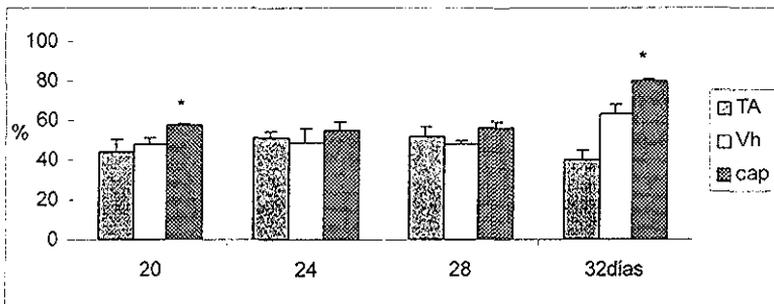


Fig. 9. Media±eem. del porcentaje de **folículos atrésicos** en el ovario izquierdo de animales testigo absoluto o inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades de la etapa infantil-juvenil. * $p < 0.05$ vs vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la prueba de U de Mann Whitney)

En la figura 6 se presenta el diámetro promedio de todos los folículos medidos en el ovario de los animales asignados a cada uno de los tratamientos. El diámetro folicular promedio fue significativamente menor en los ovarios de los animales denervados y sacrificados a los 20 ó a los 28 días de edad, mientras que a los 32 días de edad el diámetro folicular promedio fue mayor que en los animales testigo absoluto o inyectados con el vehículo.

Los ovarios de los animales sacrificados a los 20 ó 28 días de edad presentaron un mayor número total de folículos que los animales testigo. No se observaron diferencias significativas en los ovarios de los animales sacrificados a los 24 ó 32 días de edad (Fig. 7)

A la edad de 20 y de 28 días de edad el número de folículos atrésicos, sin tomar en cuenta su tamaño o su grado de diferenciación, se incrementó (Fig. 8). De igual manera, a los 28 días aumentó el número de folículos sanos (capsaicina, 133.3 ± 16.5 ; testigo, 99 ± 13.8 ; vehículo, 87.3 ± 5.5 ; $p < 0.05$) y a los 32 días de edad se da una disminución en el total de folículos sanos (capsaicina 34 ± 3.5 ; testigo, 104.1 ± 4.0 ; vehículo, 57 ± 8.6 ; $p < 0.05$)

Cuando presentamos los índices atresia evaluados como porcentaje, observamos incremento de la atresia a los 20 y 32 días de edad (Fig 9), que se acompaña por la disminución en el porcentaje de folículos sanos (20 días: capsaicina, 42.5 ± 1.1 ; testigo absoluto, 55.8 ± 5.9 ; vehículo, 51.6 ± 2.9 ; $p < 0.05$) (32 días: capsaicina, 20 ± 1 ; testigo absoluto 60 ± 4.6 ; vehículo, 37 ± 5 ; $p < 0.05$).

Para estudiar el efecto de la denervación en el crecimiento de los folículos, clasificamos a éstos en diferentes rangos de acuerdo a su tamaño. A los 20 días de edad la denervación provocó incremento en el número de folículos del rango de 100-200 μm (Fig. 10), incremento que está dado por folículos atrésicos en este rango (capsaicina, 176.7 ± 7.1 testigo, 75 ± 9.7 ; vehículo, 50.7 ± 2.7 ; $p < 0.05$).

A los 24 días de edad no se observan diferencias en el total de folículos por rangos en los diferentes tratamientos (Fig 11).

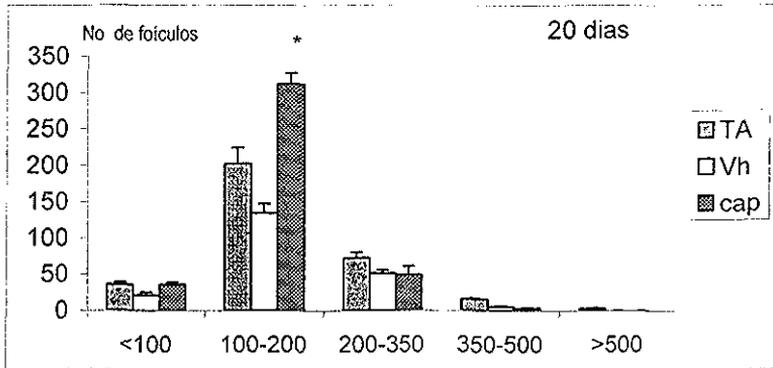


Fig. 10. Media±eem del **número total de folículos** clasificados por rangos en los ovarios de animales testigo absoluto o inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados a los 20 días de edad * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la prueba de U de Mann Whitney).

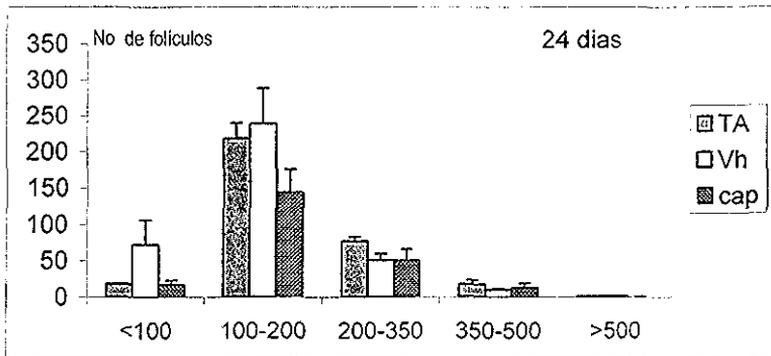


Fig. 11. Media±eem del **número total de folículos** clasificados por rangos en los ovarios de animales testigo absoluto o inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados a los 24 días de edad.

A los 28 días de edad se observó incremento en el rango de 100-200 µm (Fig. 12); dado por los folículos sanos (capsaicina, 112 ± 16.4 ; testigo, 79 ± 13.4 ; vehículo, 69 ± 5.5 ; $p < 0.05$) y atrésicos (capsaicina, 99.3 ± 17.8 testigo, 53 ± 3 ; vehículo, 40.7 ± 7.5 ; $p < 0.05$).

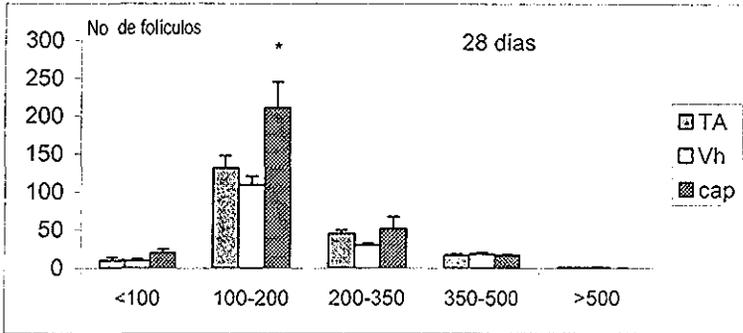


Fig. 12. Media±eem del **número total de folículos** clasificados por rangos en los ovarios de animales testigo absoluto o inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados a los 28 días de edad. * $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la prueba de U de Mann Whitney).

A los 32 días de edad existe un incremento de folículos en los rangos de 200-350 y de 350-500 µm (Fig. 13); incremento que está dado por folículos atresícos ..

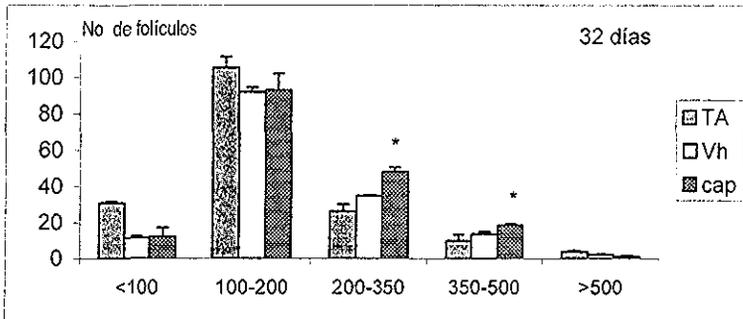


Fig.13. Media±eem del **número total de folículos** clasificados por rangos en los ovarios de animales testigo absoluto o inyectados al nacimiento con vehículo o capsaicina y sacrificados a los 32 días de edad * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis, seguida por la prueba de U de Mann Whitney)

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten sugerir que la inervación sensorial, modula de manera estimulante los mecanismos que conllevan al inicio de la pubertad y la primera ovulación. Se ha propuesto que la inervación sensorial obtiene información del funcionamiento del ovario por medio de receptores ubicados alrededor de los folículos, y dicha información es enviada a centros hipotalámicos y extra-hipotalámicos, involucrados en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, por lo que podría ser posible que la información sensorial forme parte del circuito neuroendocrino que modula la respuesta del folículo a las gonadotropinas (Domínguez y Riboni 1971, Burden 1978, Domínguez y col. 1989, Gerendai y col 1995, 1997; Morán y col , 2000a, 2001).

Existen evidencias sobre una relación funcional entre la inervación simpática y la sensorial. La eliminación de las fibras sensoriales, por la administración de capsaicina induce hiperinervación simpática en el iris, la cavidad oral y las arterias mesentéricas, mientras que la denervación simpática provoca incremento en la densidad de fibras sensoriales en el tracto urogenital (Schicho y col 1998, Luthman y col. 1989, Terenghi y col 1986) En nuestro caso, la administración de capsaicina al nacimiento no provocó incremento en la concentración de noradrenalina ovárica en todas las edades analizadas, excepto a los 24 días donde se observó aumento de la amina. Al momento no contamos con una explicación para este hecho, aunque es posible que en el ovario de rata sea difícil de observar una hiperfunción de las fibras adrenérgicas, debido a que es un órgano que recibe escasa inervación

En el aparato reproductor femenino, la densidad de las fibras nerviosas depende del desarrollo fisiológico del individuo. Durante la pubertad, la preñez y después del parto, la densidad de la inervación del cérvix y del útero varía debido a la remodelación profunda de sus tejidos. En la rata adulta, la densidad de las terminales nerviosas simpáticas es menor durante el día del

estro vaginal, en relación con las otras fases del ciclo estral (Zoubina y col 1998) En el animal preñado las fibras nerviosas autónomas del útero degeneran conforme avanza la gestación, hasta llegar a un estado particular en que éstas ya no son visibles, aunque después del parto regeneran (Haase y col 1997). La densidad de la inervación simpática del cuerno uterino es menor después de la pubertad que en las etapas previas (Brauer y col. 1995) Aunado a esto hay variaciones en la densidad de las fibras primarias aferentes, por lo que se ha sugerido que la inervación de la vagina pudiera estar participando en los mecanismos que conllevan a la canalización de la misma (inicio de la pubertad).

Los efectos de la capsaicina sobre el inicio de la pubertad dependen del modelo empleado. Razo (2000) mostró que cuando se inyecta el neurotóxico al tercer día de vida no se altera la edad en la cual se produce la canalización de la vagina, Aunque se observó una caída significativa en la concentración sérica de estradiol y progesterona De igual manera, en la rata denervada al nacimiento y hemicastrada a los 20 ó 28 días de edad no se alteró el inicio de la pubertad (Apolonio y col. 2000, 2001). En cambio Traurig y col. (1984), observaron que la administración de capsaicina en el día dos de vida provocó retraso en el inicio de la pubertad. Resultados similares a los de Traurig y col. (1984) fueron obtenidos en el presente estudio, cuando los animales fueron tratados con capsaicina al nacimiento. El retraso en la canalización vaginal sin que se observaran cambios en la concentración de esteroides, puede indicar que la capacidad de respuesta de los receptores a esteroides en el cérvix y la vagina sea menor y por lo tanto dependiente de la inervación. Dado que en el modelo utilizado partimos del supuesto de haber eliminado las vías sensoriales en vagina, nuestros resultados nos permiten sugerir que la inervación sensorial, vía sus neuropéptidos, es estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que facilitan la canalización de la vagina En apoyo a esta hipótesis, el grupo de Brauer (1994) mostró que la cantidad de SP y de CGRP

incrementan durante la pubertad, mientras que disminuye la concentración de noradrenalina

Se ha mostrado que el 95% de las fibras del nervio vago son de naturaleza sensorial. Betanzos (2001) mostró en animales vagotomizados en la etapa juvenil, un retraso en la edad en que abren vagina. Existen estudios anatómicos y fisiológicos que muestran que el nervio vago conduce información sensorial desde los ovarios y del útero hacia la base del cerebro (Burden y col. 1983, Ortega-Villalobos y col. 1990). Collins y col. (1999) mostraron que las aferencias sensoriales del útero tienen sus cuerpos celulares en el ganglio nodoso y que estas fibras tienen como principal marcador al CGRP. En conjunto estas evidencias nos permiten sugerir que el vago podría participar en la vía de señalización hacia el SNC, y forma parte del circuito neuroendocrino que regula los procesos que culminan con la canalización vaginal.

Nuestros resultados de comportamiento de cópula (evaluado por la presencia de tapón espermático) normal en las hembras denervadas y la disminución radical en el número de animales preñados, son similares a los obtenidos por Traurig y col. (1984) y Nance y col. (1987). Dichos resultados han sido explicados como una falta de comunicación entre los órganos sexuales y el sistema nervioso central lo que alteraría la liberación de la LH y la PRL, indispensables para la secreción de progesterona, hormona encargada de mantener la implantación.

La administración de capsaicina al tercer día de vida, momento en cual ya se produjo la foliculogénesis (Malamed y col 1992, Hirshfield 1991), provoca incremento en la incidencia de atresia folicular, sin cambios en el número total de folículos medibles en el día del primer estro vaginal (Razo 2000). Nuestros resultados muestran que la falta de la inervación sensorial desde el nacimiento modifica el crecimiento folicular ya que los ovarios de los animales denervados al nacimiento y sacrificados al primer estro presentan una reducción de casi el 50%

en el número total de folículos, acompañado de un índice mayor de atresia, lo que nos permite sugerir que la inervación sensorial participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico en la etapa en la que estos se forman.

Cuando los animales denervados son sacrificados a los 20 días de edad, el número total de folículos incrementa y la mayoría de ellos son atrésicos, lo que parecería indicar que a esta edad la inervación sensorial actúa como un regulador inhibitorio del desarrollo de los folículos y de la atresia, pero seguramente esta inhibición es selectiva dado que los folículos que incrementan son los que se encuentran en el rango de 100 a 200 μm de diámetro. Este efecto también se presenta a los 28 días de edad, sólo que en este caso se observa también aumento en la cantidad de folículos sanos, lo que podría interpretarse como que a esta edad la inervación sensorial regula de manera inhibitoria la reactividad del folículo a la acción de la FSH para rescatar de la atresia a algunos de los folículos.

Poco se conoce sobre el papel de la inervación sensorial en la regulación del crecimiento y desarrollo de folículos, ya que principalmente se le ha asociado a ésta con la vascularización del ovario (Calka y col 1988, Ojeda y col. 1985) Así, la sección del nervio ovárico superior, realizada a los 16 días de edad, provoca aumento en el número de folículos presentes en las gónadas 4 y 8 días después de la denervación, donde el 80 al 90% de los folículos son atrésicos (Morán y col. 2000b).

La eliminación del nervio ovárico superior induce aumento de la atresia folicular y la manipulación del sistema catecolaminérgico (por la administración de guanetidina), produce aumento en las concentraciones de SP y de CGRP (péptidos característicos de fibras sensoriales) en el útero (Brauer y col 1994). Por ello proponemos que tanto la SP como el CGRP podrían actuar como factores que estimulan la atresia. A favor de esta

interpretación están los resultados de la denervación sensorial, donde disminuye el índice de atresia.

Dado que en los animales tratados con capsaicina y sacrificados a los 24 días de edad no se modificó el patrón de crecimiento y diferenciación folicular, igual comportamiento que se observó en animales con sección del nervio ovárico superior (Morán y col 2000b), es posible suponer que a esta edad existen mecanismos homeostáticos que participan en el mantenimiento de una cuota constante de folículos en crecimiento. Estos mecanismos podrían estar relacionados con las oleadas de crecimiento folicular y atresia en la etapa juvenil (Hirshfield 1994, Mc Gee y Hsueh 2001).

En conjunto nuestros resultados nos permiten sugerir que la inervación sensorial participa en la regulación del crecimiento de los folículos pequeños a través de un sistema de comunicación entre el ovario y el sistema nervioso central, donde el hipotálamo participaría estimulando o inhibiendo dicho mecanismo por medio de la liberación de las gonadotropinas por la hipófisis, o bien por medio de la acción de los neurotransmisores liberados por las terminales simpáticas localizadas en la gónada (Fig. 14 a y b)

La disminución en el número de folículos y el alto grado de atresia observados en animales denervados y sacrificados a los 32 días de edad, podrían explicar porqué al primer estro vaginal cayó la cuota ovulatoria. Dado que también disminuyeron el número de folículos sanos $>350\mu\text{m}$ de diámetro, nos lleva a pensar que en ciclos subsecuentes la cuota ovulatoria sea baja.

Con base en los resultados obtenidos, podemos sugerir que la capacidad de respuesta del folículo con antro podría ser menor en los animales denervados, ya que la estimulación con PMSG o con PMSG+hCG no indujo la superovulación que se presenta en un animal con su inervación intacta.

La PMSG además de promover el crecimiento de los folículos, "rescata" algunos de la atresia. (Braw y Tsafiriri, 1980) El efecto de esta gonadotropina

se puede observar desde las 12 horas después de que se administra la hormona y se produce sólo sobre los folículos denominados tipo 5 y 6 (170-500 μm), (McGee y Hsueh 2000). Esto podría explicar porque en los animales denervados y sacrificados a los 28 días de edad, aumentó el número de folículos del rango de 100-200 μm de diámetro. Cuando se realizó el estímulo hormonal con gonadotropinas en el modelo del animal denervado, la administración de PMSG o de PMSG+hCG no fue "tan eficiente" como para rescatar a los folículos de la atresia y culminar con una superovulación. Esto podría indicar que la información que se genera en las fibras sensoriales podría actuar directa o indirectamente en la "traducción" del efecto de las gonadotropinas.

En nuestro estudio la concentración sérica de progesterona es menor en todas las edades estudiadas, a diferencia de lo observado por Traurig y col. (1988) en animales adultos que fueron denervados en la etapa neonatal, quienes no observaron diferencias en este parámetro.

Es probable que la disminución de progesterona que observamos en las hembras denervadas, se deba a alteraciones funcionales en las células de la teca, donde pudiera hacer falta algún factor que estimule el paso de pregnenolona a progesterona. Debido a una falta de estimulación por parte de las gonadotropinas sobre la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) (Davoren y Hsueh 1985, Leung y Steele, 1992). No podemos descartar que la alteración se haya dado en la expresión de la P450_{scc} lo que se traduciría como una menor síntesis de progesterona.

La secreción de estradiol prácticamente no se modifica por la denervación sensorial. Lo que nos permite postular que el proceso de aromatización en las células de la granulosa no se ve alterada por la falta de la información sensorial.

Con base en los resultados del presente estudio proponemos que la inervación sensorial es uno de los componentes funcionales del eje gónada-

hipotálamo para el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico.

CONCLUSIONES

- ✧ La inervación sensorial del tracto reproductivo, participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la pubertad.
- ✧ La información sensitiva del ovario tiene un papel estimulante en la ovulación y modula la respuesta del folículo a las gonadotropinas.
- ✧ La inervación sensorial del ovario tiene un efecto inhibitorio sobre el paso de folículos del grupo de reserva al de crecimiento.
- ✧ Una vez que el folículo ha adquirido respuesta a las gonadotropinas, la información sensorial modula de manera estimulante su crecimiento y diferenciación.
- ✧ Durante la etapa juvenil la información sensorial modula de manera estimulante a las células de la teca en la secreción de progesterona, y no interviene en la regulación de la síntesis de estradiol, por parte de las células de la granulosa.

hipotálamo para el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico.

CONCLUSIONES

- ✧ La inervación sensorial del tracto reproductivo, participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendócrinos que regulan la pubertad.
- ✧ La información sensitiva del ovario tiene un papel estimulante en la ovulación y modula la respuesta del folículo a las gonadotropinas.
- ✧ La inervación sensorial del ovario tiene un efecto inhibitorio sobre el paso de folículos del grupo de reserva al de crecimiento.
- ✧ Una vez que el folículo ha adquirido respuesta a las gonadotropinas, la información sensorial modula de manera estimulante su crecimiento y diferenciación.
- ✧ Durante la etapa juvenil la información sensorial modula de manera estimulante a las células de la teca en la secreción de progesterona, y no interviene en la regulación de la síntesis de estradiol, por parte de las células de la granulosa.

MODELO PROPUESTO PARA EXPLICAR LA PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN EN LAS FUNCIONES DEL OVARIO

En la fig. 14 a se ilustran las vías por las que la inervación sensorial llega de la periferia al mesencéfalo. El soma de las fibras sensoriales que provienen del ovario, se encuentra localizado en el ganglio de la raíz dorsal y de ahí envía sus proyecciones hacia el núcleo del tracto solitario, que es un regulador de las aferencias y eferencias autonómicas de los órganos viscerales. Por una parte, éste centro regulador podría enviar respuestas autonómicas simples hacia la parte del ovario de donde proviene la señal sensorial y por otra, actúa integrando la señal autónoma por medio de la participación de centros hipotalámicos y extrahipotalámicos.

En la fig. B se representa la respuesta eferente acarreada por las fibras simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo. Las eferencias salen del núcleo paraventricular y lateral del hipotálamo, el núcleo parabraquial, el núcleo del tracto solitario y de ciertos grupos neuronales localizados en las regiones A5-A7 (monoaminérgicos).

Con los resultados de este trabajo, proponemos que las señales sensoriales provenientes del ovario, específicamente del entorno folicular, participan en la regulación de sus funciones a través del circuito que involucra la participación del hipotálamo como regulador tanto de la función endócrina como de la neural (información autónoma)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

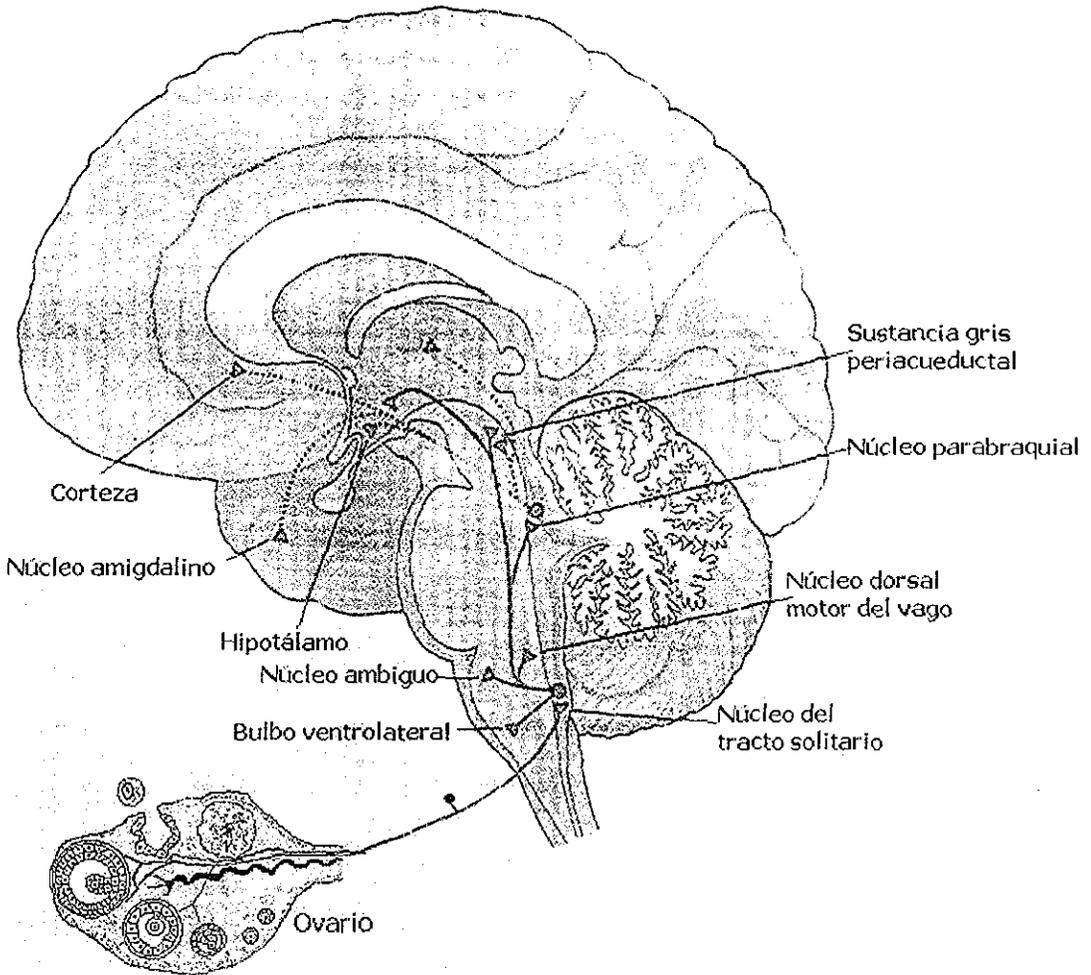


Figura 14 a. Modelo que explica la participación de la inervación sensorial en las funciones del ovario. Modificado de E. Kandell 2001.

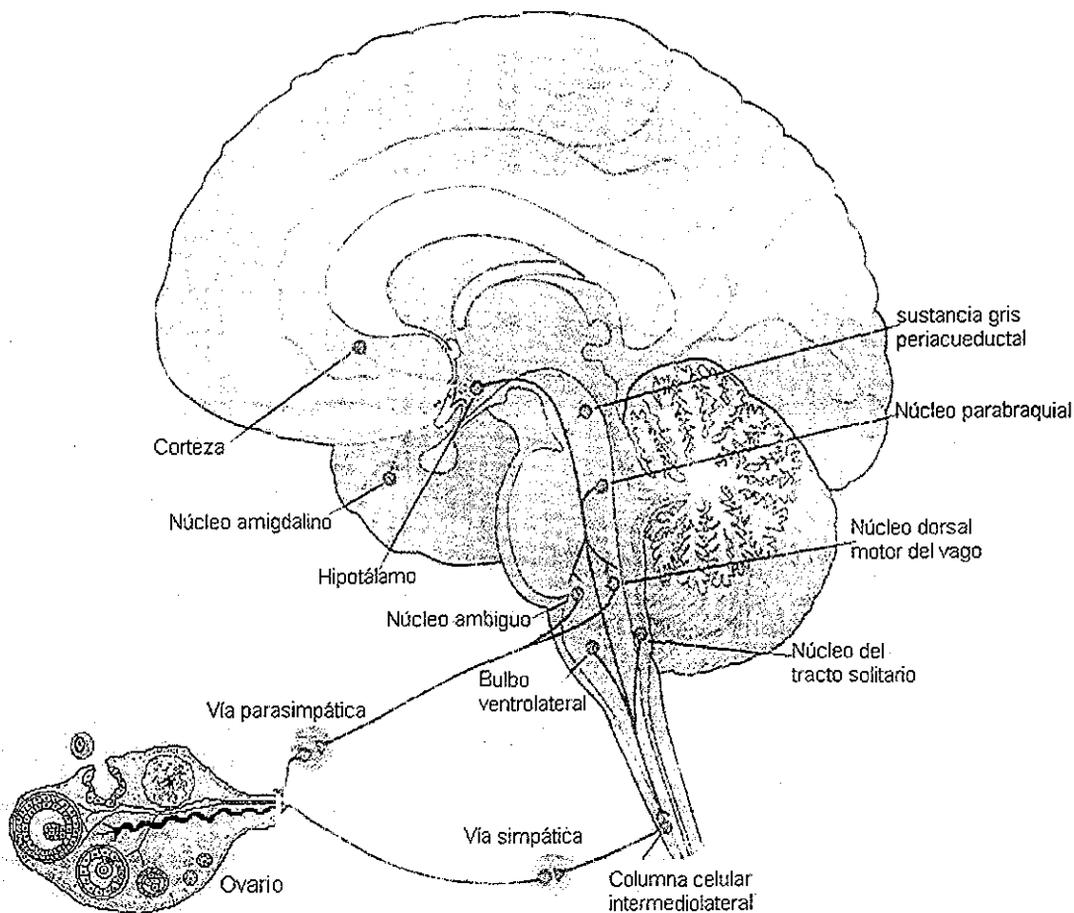


Figura 14 b. Modelo que explica la participación de la inervación simpática en las funciones del ovario. Modificado de E. Kandell 2001.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

BIBLIOGRAFÍA

- Aberdeen J, Corr I, 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
- Advis JP, Ahmed CE y Ojeda SR 1989. Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) levels in developing ovary. *Brain Research Bulletin* 22:605-610.
- Ahmed CE, Dees WL y Ojeda SR 1986. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and response to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* 118:1682-1689.
- Apolonio J, Morales L y Domínguez R 2000. Efecto de la denervación sensorial sobre la hipertrofia compensadora del ovario. XLIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Can Cún, Quintana Roo, México.
- Apolonio J, Morales L y Domínguez R 2001. Efecto de la denervación sensorial sobre la esteroidogénesis. XLIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas. 26-30 de agosto. Monterrey Nuevo León.
- Betanzos GR 2001. Estudio de la participación del nervio vago en los mecanismos neuroendócrinos que regulan el inicio de la pubertad espontánea de la rata hembra. Tesis Profesional. FES Zaragoza UNAM.
- Brauer MM, Lincoln J, Sarnar S, Blundell D, Milner P, Passaro M y Burnstock G 1994. Maturation changes in sympathetic and sensory innervation of the rat uterus: Effects of neonatal capsaicin treatment. *International Journal of Developmental Neuroscience* 12:157-171.
- Brauer MM, Corbacho AM y Burnstock G 1995. Effects of chronic and acute oestrogen treatment on the developing noradrenaline-containing nerves of the rat uterus. *International Journal of Developmental Neuroscience* 13 791-798.
- Braw RH y Tsafiriri A 1980. Effect of PMSG on follicular atresia in the immature rat ovary. *Journal of Reproduction and Fertility* 59:267-272.
- Brodal P 1996. The Autonomic Nervous System In: The Central Nervous System pp 343-367.
- Burden HW 1978. Ovarian innervation En: The vertebrate ovary: comparative biology. RE Jones (Ed.) Plenum Press, New York. Cap. 18, 616-638pp
- Burden HW y Lawrence IE 1977. The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology* 23:368-378.

- Burden HW, Lawrence IE Jr., Louis TM y Hodson CA 1981. Effect of abdominal vagotomy on the oestrus cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy *Neuroendocrinology* 33:218-222
- Burden HW, Leonard M, Smith CP y Lawrence IE 1983a. The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *The anatomical Record* 207:623-627.
- Burden HW, Lawrence IE Jr, Louis MT, Hodson CA 1983b. Abdominal vagotomy does not activate the corpus luteum in rats. *Neuroendocrinology* 37:288-290.
- Burden HW 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.
- Burks TF, Buck SH y Miller MS 1985. Mechanisms of depletion of substance P by capsaicin. *Federation Proceedings* 44:2531-2534.
- Calka J, McDonald JK y Ojeda SR 1988. The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biology of Reproduction* 39:1215-1223
- Carlson RR y DeFeo JV 1965. Role of the pelvic nerves vs. the abdominal sympathetic nerves in the reproductive function of the female rat. *Endocrinology* 77:1014-1022.
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD y Julius D 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature* 389:816-824.
- Collins JJ, Lin CE, Berthoud HR y Papka RE 1999. Vagal afferents from the uterus and cervix provide direct connections to the brainstem. *Cell and Tissue Research* 295: 43-54.
- Cotton J, Traurig HH y Papka R 1983. Substance P and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in the female reproductive system. *Anatomical Record* 205: 38A-39A.
- Chung K, Schwen RJ y Coggeshall RE. 1985. Ureteral axon damage following subcutaneous administration of capsaicin in adult rats. *Neuroscience Letters* 53:221-226.
- Crowley C, Spencer S y Nishimura MC. 1994. Mice lacking nerve growth factor display perinatal loss of sensory and sympathetic neurons yet develop forebrain cholinergic neurons. *Cell* 76:1001-1012.
- D'Albora H, Lombide P y Ojeda SR 2000. Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Research* 300:47-56
- Davoren JB y Hsueh AJW 1985 Vasoactive Intestinal Peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biology of Reproduction* 33:37-52

- Dees WL, Ahmed CE y Ojeda SR 1986. Substance P and Vasoactive Intestinal Peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology* 119:638-641.
- Dees WL, Kozlowski GP, Dey R y Ojeda SR 1985. Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. II. Immunocytochemical localization. *Biology of Reproduction* 33: 471-476.
- Diamond J, Coughlin M, Masintyre L, Holmes M y Vishean B 1987. Evidence that endogenous β nerve growth factor is responsible for the collateral sprouting, but not regeneration, of nociceptive axons in adult rats. *Proceeding Natural Academic Science* 84:65-96.
- Dissen G, Dees WL y Ojeda SR 1993. Neural and neurotrophic control of ovarian development. En: The ovary. EY Adashi y Leung PCK (Eds.) Raven Press, New York, 1-119.
- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Ma YJ y Ojeda SR 1991. Nerve growth factor receptors in the peripubertal rat ovary. *Molecular Endocrinology* 5:1642-1650.
- Dissen GA, Malamed S, Gibney JA, Hirshfield AN, Costa ME, Ma YJ y Ojeda SR 1992. Neurotrophins are required for follicular formation in the mammalian ovary. 18:463.10. 22nd Annual Meeting. Society for Neuroscience.
- Dockray GJ y Sharkey KA 1986. Neurochemistry of visceral afferent neurons. En: Progress in Brain Research. F Cervero y JBBF Morrison (Eds) Vol. 67 Elsevier Amsterdam pp 143-148.
- Domínguez R y Riboni L 1971. Failure of ovulation in autographed ovary of the hemispayed rat. *Neuroendocrinology* 7:164-170.
- Domínguez R, Cruz ME y Chávez R 1989. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En: Growth Factors and the Ovary. AM Hirshfield (Ed). New York: Plenum Press, pp 321-325
- Fitzgerald M 1983. Capsaicin and sensory neurons- a review. *Pain* 15:109-130.
- Franco-Cereceda A, Henke H, Lundberg JM, Petermann JB, Hökfelt T y Fischer JA 1987. Calcitonin gene-related peptide (CGRP) in capsaicin-sensitive substance P-immunoreactive sensory neurons in animals and man: Distribution and release by capsaicin. *Peptides* 8:399-410.
- Funkenstein B, Nimrod A y Lindner HR 1980. The development of steroidogenic capability and responsiveness to gonadotropins in cultured neonatal ovaries. *Endocrinology* 106:98-106.
- Gabella G y Peace HL 1973. Number of axons in the abdominal vagus of the rat. *Brain Research* 58:465-469.



- Gamse R, Wax A, Zigmond RE, y Leeman SE 1981. Immunoreactive substance P in sympathetic ganglia: Distribution and sensitivity toward capsaicin *Neuroscience* 6:437-441.
- George FW y Ojeda SR 1987. Vasoactive Intestinal Peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. *Proceeding National Academic of Sciences USA* 84:5803-5807.
- Gerendai I, Csaba Zs, Vokó Z y Csernus V 1995. Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 53 299-305.
- Gerendai I y Halász B 1997. Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinology* 18:354-381.
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkői Z, Medveczky I y Halász B 2000. CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of Autonomic Nervous System* 80:40-45.
- Gilbert RFT Emson PC, Fahrenkrug J, Lee CM, Penman E y Wass J 1980. Axonal transport of neuropeptides in the cervical vagus nerve of the rat. *Journal of Neurochemistry* 34:108-113.
- Hasse EB, Buchman J, Tietz AE y Schramm LP 1997. Pregnancy induced uterine neuronal degeneration in the rat. *Cell and Tissue Research* 288:293-306.
- Helliwell RJA, McLatchie LM, Clarke M, Winter J, Bevan S y McIntyre P 1998. Capsaicin sensitivity is associated with the expression of the vanilloid (capsaicin) receptor (VR1) mRNA in adult rat sensory ganglia. *Neuroscience Letters* 250: 177-180.
- Hill TR 1962. Paradoxical effects of ovarian secretion. En: The ovary. Zuckerman y Weir (Eds.) Academic Press. 231-261.
- Hirshfield AN 1991. Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology* 124: 43-101.
- Hirshfield AN 1994. Relationship between the supply of primordial follicles and the onset of follicular growth in rats. *Biology of reproduction* 50:421-428.
- Holzer P 1988. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and others neuropeptides. *Neuroscience* 243:739-768.
- Holzer P 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action , and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews* 43:143-201.
- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC y Welsh TH Jr. 1994. Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells *Endocrine Review* 5:76-127

- Kannisto P, Ekblad E, Helm G, Owman Ch, Sjöberg NO, Stjernquist M, Sundler F y Walles B 1986. Existence and coexistence of peptides in nerves of the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histochemistry* 86:25-34.
- Klein CM y Burden HW 1988a. Anatomical localisation of afferent and postganglionic sympathetic neurones innervating the rat ovary. *Neuroscience letters* 85:217-222.
- Klein CM y Burden HW 1988b. Substance P and vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive nerve fibers in relation to ovarian postganglionic perikarya in para- and prevertebral ganglia: evidence from combined retrograde tracing and immunocytochemistry. *Cell and Tissue Research* 252 403-410
- Kumazawa T 1986. Sensory innervation of reproductive organs. *Progress in Brain Research* 6:115-130.
- Lara H E, Mc Donald JK y Ojeda SR 1990a. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology* 126:364-375.
- Lara HE, Mc Donald JK, Ahmed CE y Ojeda SR 1990b. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127:2199-2209.
- Lawrence IE, Burden HW y Louis TM 1978. Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentration and fetal resorption. *Journal of Reproduction and Fertility* 53:131-136.
- Lawrence IE Jr. y Burden HW 1980. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The anatomical Record* 196:51-59
- Leung PC y Steele GL 1992. Intracellular Signaling in the gonads. *Endocrine Reviews* 13:476-498.
- Lewin GR y Mendell LM 1993. Nerve Growth Factor and nociception. *Trends of Neuroscience* 16:353-359.
- Lundberg JM y Saria A 1993. Capsaicin-sensitive sensory nerves in the airways implications for protective reflexes and disease. En: Capsaicin in the Study of Pain JN Wood (ed) pp 219-2382.
- Lunenfeld B, Kraiem Z y Eshkol A 1975. The function of the growing follicle. *Journal of Reproduction and Fertility* 45:567-574.
- Luthman J, Strömberg I, Broding E y Jonsson G 1989. Capsaicin treatment to developing rats induces increase of noradrenaline levels in the iris without affecting the adrenergic terminal density. *International Journal of Developing Neuroscience* 7:613-620.

Malamed S, Gibney JA y Ojeda SR 1992 Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell and Tissue Research* 270 87-93.

Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME y Ojeda SR 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* 138:3320-3329.

Mc Gee EA y Hsueh AJW 2000. Initial and cyclic recruitment of ovarian Follicles. *Endocrine Reviews* 21:200-214.

McNeill D y Burden HW 1987. Neuropeptides in sensory perikarya projecting to the rat ovary. *American Journal of Anatomy* 179 269-276.

Miller MS, Buck SH, Sipes IG, Yamamura HI y Burks TF 1982. Regulation of substance P by nerve growth factor: Disruption by capsaicin. *Brain Research* 250: 193-196.

Mitchel GAG 1988. The innervation of the ovary, uterine tube, testis and epididimus. *Journal of Anatomy* 72:508-517.

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

Morales L, Chávez R, Ayala ME 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.

Morán C, Razo SR, Morales L y Domínguez R 2000a. Efectos de la denervación sensorial sobre la pubertad. XXV reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. Taxco, Gro.

Morán C, Morales L, Quiróz U y Domínguez R 2000b. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *Journal of Endocrinology* 166:205-211.

Morán C, Morales L, Chavira R y Domínguez R 2001. Efectos de la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina al nacimiento, sobre la esteroidogénesis y el desarrollo folicular durante la etapa juvenil de la rata. XXVI reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C. Acapulco, Gro.

Nakamura Y, Kato H y Terranova PF 1992. Abdominal vagotomy decreased the number of ova shed and serum progesterone levels in estrus in the cyclic hamster. *Endocrinology Japanese* 39:141-145

Nance DM, King TR y Nance PW 1987 Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats. *Brain Research Bulletin* 18:109-114

Nance DM, Burns J, Klein CM y Burden HW 1988. Afferent fibers in the reproductive system and pelvic viscera of female rats: Anterograde tracing and immunocytochemical studies. *Brain Research Bulletin* 21:701-709.

Ojeda SR, Hite SS, Aguado IL, Advis JP y Andersen JM 1983. Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat. *Neuroendocrinology* 36:261-267.

Ojeda SR, Costa ME, Katz KH y Hersh LB 1985. Evidence for the existence of substance P in the pre-pubertal rat ovary. I Biochemical and physiological studies. *Biology of Reproduction* 33:286-295.

Ojeda SR y Urbanski HF 1994. Puberty in the rat. En: The physiology of Reproduction. E. Knobil y J.D. Neill (Eds.). Raven Press, New York. 363-409.

Ortega-Villalobos M, García-Bazan M, Solano-Flores LP, Ninomiya-Alarcon JG, Guevara-Guzmán R 1990. Vagus nerve afferent and efferent innervation of the rat uterus; an electrophysiological and HRP study. *Brain Research Bulletin* 25:365-371.

Papka RE, Cotton JP y Traurig HH 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 and Tissue Research* 242:475-490.

Papka RE, Cotton JP y Traurig H 1996. 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 and Tissue Research* 242:475-490.

Peters H 1979. Some aspects of early follicular development En: Ovarian follicular development and function. AR Midgley y WA Sadler (Eds). New York Raven Press. 1-13.

Powly TL, Precht JC, Fox EA y Berthoud HR 1983. Anatomical considerations for surgery of the rat abdominal vagus: distribution, paraganglia and regeneration. *Journal of Autonomic Nervous System* 9:79-97.

Ralevic V, Karoon P y Burnstock G 1995. Long-term sensory denervation by neonatal capsaicin treatment augments sympathetic neurotransmission in rat mesenteric arteries by increasing levels of norepinephrine and selectively enhancing postjunctional actions. *The Journal of Pharmacology and experimental therapeutics* 274:64-71.

Razo SR. 2000. Participación de la inervación sensorial en el proceso de foliculogénesis. La rata púber como modelo de estudio. Tesis profesional FES Zaragoza UNAM.



- Sann H, Jancsó G, Ambrus A y Pierau FK 1995. Capsaicin treatment induces selective sensory degeneration and increase sympathetic innervation in the rat ureter. *Neuroscience* 67:953-966.
- Schicho R, Kanai Y, Ishikawa T, Skofitsch G y Donnerer 1998. Involvement of NGF in the induction of increased noradrenergic innervation of the ureter in neonatally capsaicin-treated rats. *Journal of Autonomic Nervous System* 73:46-53.
- Steiner R, Cameron J, McNeill T, Clifton D y Bremmer W 1983. Metabolic signal for the onset of puberty. En: Neuroendocrine aspects of reproduction. R.L. Norman (ed.) New York Academic Press. 183-229.
- Szallasi A and Blumberg PM 1992. Vanilloid receptor loss in rat sensory neurons associated with long term desensitization to resiniferatoxin. *Neuroscience Letters* 136:51-54.
- Szallasi A 1994. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. *Gen Pharmacology* 25: 223-243.
- Szallasi A 1995 Autoradiographic visualization and pharmacological characterization of vanilloid (capsaicin) receptors in several species, including man. *Acta Physiological Scandinavian* 155:1-68.
- Szallasi A y Blumberg P 1999. Vanilloid (capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews* 51: 159-211.
- Terenghi G, Zhang S-Q, Unger WG y Polak JM 1986. Morphological changes of sensory CGRP-immunoreactive and sympathetic nerves in peripheral tissues following chronic denervation. *Histochemistry* 86:89-95.
- Traurig H, Saria A y Lembeck, F 1984. The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:254-259.
- Traurig HH, Cotton J, Papka R, Saria A y Lembeck F 1983. Substance P in the female reproductive system and the effects of capsaicin. *Neuroscience Abstract* 9:11.
- Traurig HH, Papka RE y Rush ME 1988. Effects of capsaicin on reproductive function in the female rat: Role of peptide-containing primary afferent nerves innervating the uterine cervix in the neuroendocrine copulatory response. *Cell and Tissue Research* 253:573-581.
- Vogel KS 1992. Origins and early development of vertebrate cranial sensory neurons. En: Sensory Neurons. Diversity, Development, and Plasticity. SA Scott (ed) pp 171-193, Oxford University Press, New York.
- Wardle KA, Ranson J y Sanger GJ 1997. Pharmacological characterization of the vanilloid receptor in the rat dorsal spinal cord. *British Journal of Pharmacology* 121:1012-1016.

Winter J, Forbes CA, Sternberg J y Lindsay RM 1988. Nerve growth factor (NGF) regulates adult rat cultured dorsal root ganglion neuron responses to capsaicin. *Neuron* 1:973-981.

Winter J 1998. Brain derived neurotrophic factor, but not nerve growth factor, regulates capsaicin sensitivity of rat vagal ganglion neurones. *Neuroscience Letters* 241:21-24.

Zoubina EV, Fan Q y Smith PG 1998. Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *The Journal of Comparative Neurology* 397:561-571.



**ACADEMIA DE INVESTIGACION EN
BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION, A.C.**

XXIII REUNION ANUAL

*Cuernavaca, Morelos
24-27 de Mayo de 1998*

MESA DIRECTIVA

1997 - 1998

**Presidente
Josué Garza-Flores**

**Vicepresidente
Carlos Villanueva Díaz**

**Secretario
Raquel Huerta Franco**

**Prosecretario
Ma. Eugenia Chavarria**

**Consejeros
Carlos Morán Villota
Felipe Vadillo Ortega**

EFFECTOS DE LA DENERVACIÓN SENSORIAL SOBRE LA PUBERTAD DE LA RATA HEMBRA

C. Morán, I. Morales, U. Quiróz y R. Domínguez. Laboratorio de Fisiología Reproductiva UBR. FES Zaragoza U.N.A.M.

INTRODUCCIÓN

Existen numerosas evidencias experimentales que muestran que la inervación extrínseca de la gónada modula los efectos de las gonadotropinas sobre el crecimiento folicular y la ovulación (Burden 1985; Ojeda y Urbanski 1994). La inervación simpática llega a la gónada por dos rutas: la del plexo ovárico y la del nervio ovárico superior (Burden, 1985; Lawrence y Burden 1980; Klein y Burden, 1988). Por estudios de inmunohistofluorescencia se ha mostrado que las fibras que viajan por el nervio ovárico superior establecen contacto con las células de la teca y del tejido intersticial, mientras que las del plexo ovárico están asociadas con los vasos sanguíneos (Kannisto y col 1986; Ahmed y col 1986; Dees y col 1985; Ojeda y col 1986). En las fibras del nervio ovárico superior se ha mostrado la presencia del péptido intestinal vasoactivo (VIP por sus siglas en inglés) mientras que las que llegan por el plexo ovárico presentan sustancia P.

Además de la inervación simpática, las gónadas reciben fibras sensoriales de las que no se conoce su localización exacta dentro del ovario, pero se cree que están relacionadas con los vasos sanguíneos (Kumazawa, 1986). Los nervios sensoriales del sistema nervioso autónomo se proyectan desde los ganglios sensoriales autónomos y la transmisión neural entre estos nervios involucra un amplio rango de neuropéptidos, incluyendo a la sustancia P, los péptidos opioides la colecistoquinina, el neuropéptido Y (NPY) y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) (Brown, 1994).

El tipo de receptor sensorial encontrado en los órganos reproductivos es de tipo polimodal. Al parecer estos receptores juegan un papel importante en la función nociceptiva y en la regulación de la inervación autónoma en sitios donde ambos tipos de inervación confluyen y se sabe que ambos proliferan en etapas tempranas del desarrollo del sistema nervioso (Kumazawa, 1986).

En el estudio de la participación de la inervación sensorial en los procesos reproductivos, se ha utilizado el modelo de desnervación farmacológica, empleando varios fármacos que garantizan la destrucción de las fibras sensoriales, tal es el caso de la capsaicina (Jancsó y Király, 1981; Gamse, 1982).

El tratamiento sistémico con capsaicina en la etapa neonatal o su aplicación local, resulta en la destrucción permanente de las fibras nerviosas primarias aferentes que contienen sustancia P. Lo mismo sucede cuando se seccionan los nervios hipogástricos y pélvicos (Cotton y col 1983; Gu y col., 1983).

La sustancia P es un neuropéptido presente en los nervios primarios aferentes (fibras C) (Lembeck y Gamse, 1982), los cuales inervan el tracto reproductivo de la hembra (Cotton y col 1983; Traurig y col 1983, 1984; Berkley y col 1990).

Según Gamse y col. (1981), las fibras sensoriales modulan la función de los órganos reproductores indirectamente a través de la liberación de sustancia P como un neurotransmisor.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

de sinapsis en neuronas autónomas de tipo adrenérgico. En el iris de la rata (área que presenta una abundante inervación de tipo sensorial) la denervación neonatal con capsaicina induce un incremento en la concentración de noradrenalina (NA) en las terminales nerviosas simpáticas sin afectar la densidad de la terminal: el incremento en la concentración de la amina requiere no solo de la disminución en la cantidad de sustancia P sino también de la pérdida de fibras inmunoreactivas a sustancia P (Luthman y col 1989). La disminución de los péptidos en las neuronas sensoriales es probablemente una consecuencia de la acción neurotóxica de la capsaicina, pero esto no es la causa de la disfuncionalidad de la neurona. Si el soma de la neurona sensorial no degenera la manifestación de la neurotoxicidad puede ser reversible de manera pausada mientras que la degeneración del soma resulta en un efecto neurotóxico irreversible (Helzer 1991).

La inyección de capsaicina a la rata neonatal provoca retraso en la edad de la canalización de la vagina, disminución del peso corporal, de la proporción de hembras que son receptivas al macho la tarde del proestro y de las hembras que quedan preñadas (Traurig y col 1984). Con base en estos resultados se ha sugerido que se requiere de la información sensorial que se origina en el cervix y la vagina durante la copula para que se pueda cerrar el circuito a nivel hipotalámico y llevar a cabo una respuesta decidual adecuada (Traurig y col 1984; Burden y col 1981).

Ya que se ha mostrado que la inervación simpática y la sensorial que coexisten en el ovario pueden tener efectos sinérgicos, en este trabajo se analizaron los efectos de la falta de información sensorial provocada por la administración de capsaicina al nacimiento sobre la pubertad espontánea y el crecimiento folicular.

METODOLOGÍA

Se utilizaron ratas de la cepa C11Z-V, mantenidas en condiciones controladas de luz-oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h) con libre acceso al agua y alimento. Al nacimiento las crías se separaron en camadas de cinco hembras y un macho. Los animales tuvieron libre acceso a la madre hasta el momento del destete (21 días) y al agua y alimento a partir de ese momento. Los animales fueron pesados una vez por semana y fueron divididos al azar en los siguientes grupos experimentales:

Grupo tratado con capsaicina. Ratas recién nacidas inyectadas s.c. con 50 mg/100 g de peso corporal de capsaicina (8-metil-N-vainillil-6-nonenamida) (Sigma Chemical Co. St. Louis MO. EE.UU.), disuelta en vehículo compuesto por 10% de etanol, 10% de Tween 80 y 80% de solución salina (0.9%) en 0.01 ml. Una vez inyectados los animales fueron retornados con la madre.

Grupo testigo inyectado con el vehículo. Los animales fueron inyectados con 0.01 ml del vehículo.

Grupo testigo absoluto. Formado por animales intactos sacrificados al primer estro vaginal.

Todos los animales fueron revisados diariamente a partir de los 22 días de edad para determinar la edad de la apertura vaginal. A partir de ese momento se tomaron frotis vaginales diarios y los animales fueron sacrificados en el día del primer estro vaginal.

A la autopsia se disecaron las trompas uterinas y se buscó la presencia de ovocitos. los que fueron contados con la ayuda de un microscopio estereoscopio. Se disecaron y pesaron en balanza de precisión, los ovarios y el útero. Los ovarios de las ratas de cada grupo experimental se dividieron en dos lotes para ser procesados por separado de la siguiente manera:

En el primer lote, los ovarios fueron fijados en líquido de Bouin, incluidos en parafina se realizaron cortes seriados de 10 µm, que fueron teñidos con hematoxilina-eosina: los ovarios derecho e izquierdo fueron procesados individualmente. En los cortes se realizó el análisis de la población folicular, siguiendo la metodología habitual del laboratorio (Morales y Morán, 1996). Los folículos fueron clasificados en sanos o atrésicos, según los siguientes criterios: folículo atrésico aquel que presentó al menos una de las siguientes características: picnosis nuclear de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa engrosamiento de las capas celulares de la teca o alteración del ovocito.

En el segundo lote, los ovarios fueron congelados por separado, a -70 °C y posteriormente procesados para medir el contenido de noradrenalina por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) siguiendo la metodología habitual del laboratorio (Chávez y col, 1994).

Análisis estadístico. Los resultados del número de ovocitos liberados, la edad de la apertura vaginal del primer estro y del número de folículos fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de "U" de Mann-Whitney. El peso corporal, de los ovarios y el útero fueron analizados por la prueba de análisis de varianza multifactorial (ANDEVA), seguida por la prueba de Tukey. En todos los casos se aceptó como diferencia estadísticamente significativa aquella cuya probabilidad fue igual o menor al 5%.

RESULTADOS

A los 32 y 37 días de edad, el peso corporal de los animales inyectados con capsaicina fue menor que el de los grupos testigo o tratados con vehículo (Figura 1). Los animales con denervación sensorial presentaron retraso en la edad de la apertura y primer estro vaginal. Debido a ello, el peso corporal de los animales denervados fue significativamente mayor que el de los animales testigo y tratados con vehículo. La tasa de animales ovulantes en el día del primer estro vaginal fue similar en los animales denervados y los grupos testigo (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm e.e.m. de la edad (en días) de la apertura vaginal, del primer estro vaginal y del porcentaje de animales ovulantes en ratas testigo absoluto, inyectadas con vehículo o con capsaicina en la etapa neonatal.

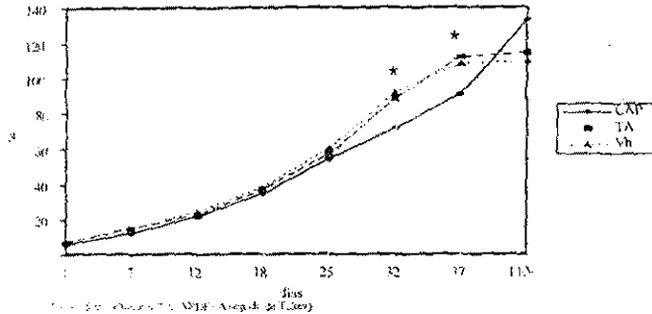
Grupo	n	Peso corporal (g)	Edad de la apertura vaginal	Edad del primer estro vaginal	% de animales ovulantes
Testigo absoluto	10	114.6 \pm 3.7	36.5 \pm 0.2	38.0 \pm 0.5	94
Vehículo	11	109.8 \pm 2.9	37.6 \pm 0.2	38.8 \pm 0.5	95
Capsaicina	22	133.3 \pm 3.8* Δ	40.5 \pm 0.36* Δ	45.4 \pm 1.26* Δ	83.5

* P<0.05 vs vehículo (Kruskal Wallis)

Δ P<0.05 vs testigo absoluto (Kruskal Wallis)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1 Media del peso corporal a lo largo del desarrollo en ratas testigo absoluto inyectadas con vehículo o con capsaicina en la etapa neonatal



El número total de ovocitos liberados por los animales con desnervación sensorial fue significativamente menor que el de los testigo absoluto o inyectados con vehículo. En los ovarios de los animales desnervados la concentración de noradrenalina ovárica fue similar al del grupo testigo absoluto y significativamente mayor que el del grupo de animales inyectados con el vehículo (tabla 2)

Tabla 2. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados y de la concentración de NA ovárica (ng/mg) al primer estro vaginal en ratas testigo absoluto, inyectadas con vehículo o con capsaicina en la etapa neonatal, sacrificadas en la mañana del día del primer estro vaginal.

Grupos	ovocitos ovario izquierdo	ovocitos ovario derecho	ovocitos totales	concentración de NA ovárica
Testigo absoluto	4.4 \pm 0.4	4.0 \pm 0.4	8.2 \pm 0.3	0.67 \pm 0.1
Vehículo	4.3 \pm 0.3	4.7 \pm 0.4	9.0 \pm 0.3	0.51 \pm 0.04
Capsaicina	3.3 \pm 0.5	3.5 \pm 0.3	6.8 \pm 0.5 *	0.63 \pm 0.07 *

* P < 0.05 vs vehículo (Kruskal Wallis o ANDEVA seguida de Tukey)

* P < 0.05 vs testigo absoluto (Kruskal Wallis)

El peso absoluto (mg) y relativo (mg/100g de peso corporal) de los ovarios de los animales desnervados fue significativamente mayor que el de los testigo y tratados con vehículo. El peso absoluto del útero de los animales desnervados fue mayor que el del grupo con vehículo. No se observaron diferencias significativas en los pesos relativos (tabla 3)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Tabla 3. Media \pm e. s. m. del peso de los ovarios y del útero (valores absolutos y relativos) en ratas testigo absoluto, inyectadas con vehículo o con capsaicina en la etapa neonatal, sacrificadas en la mañana del día del primer estro vaginal.

Grupo	Masa Ovárica		Útero	
	mg	mg/100g	mg	mg/100g
Testigo absoluto	36.7 \pm 1.4	32.2 \pm 1.3	165.9 \pm 8.0	144.9 \pm 5.2
Vehículo	31.8 \pm 1.3*	29.2 \pm 1.4	153.5 \pm 5.7	140.1 \pm 4.6
Capsaicina	49.0 \pm 1.9*	36.8 \pm 1.4*	203.9 \pm 11.8*	152.1 \pm 6.8

* P<0.05 vs testigo absoluto (ANDEVA seguida de Tukey)

* P<0.05 vs vehículo (ANDEVA seguida de Tukey)

El número total de folículos medidos en los ovarios de las ratas denervadas fue significativamente menor que en las hembras tratadas con vehículo (155.0 \pm 14.1 vs 277.0 \pm 6.7, p<0.05)

Cuando se analizó la población folicular en función de su diámetro, se observó que los folículos que se vieron afectados por la falta de información sensorial son los menores de 350 μ m de diámetro, que disminuyen en aproximadamente un 40% mientras que los mayores de 350 μ m no se modificaron (Tabla 4)

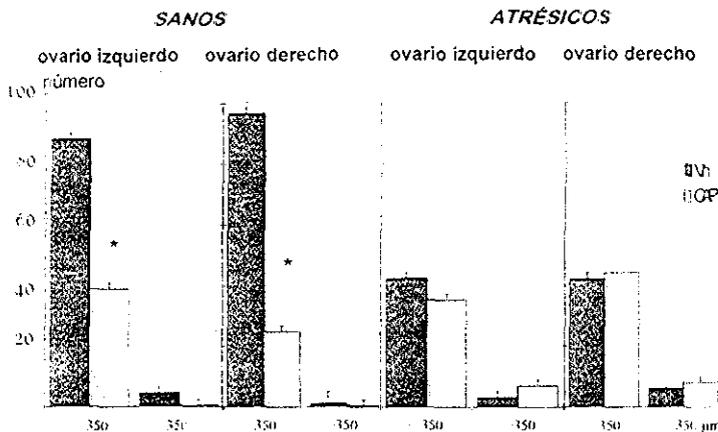
Tabla 4. Media \pm e. s. m. del número total de folículos por ovario y por diámetro en los animales tratados con capsaicina o vehículo al nacimiento y sacrificadas al primer estro vaginal.

	< 350 μ m		> 350 μ m	
	Vehículo	Capsaicina	Vehículo	Capsaicina
Total	131.2 \pm 4.5	69.5 \pm 5.0*	8.7 \pm 1.1	7.8 \pm 1.5
Ovario Izquierdo	127.3 \pm 9.5	69.7 \pm 9.0*	8.0 \pm 0.6	7.3 \pm 1.4
Ovario Derecho	135.0 \pm 3.8	69.3 \pm 8.1*	9.3 \pm 2.6	8.3 \pm 3.3

* P<0.05 vs vehículo (Kruskal Wallis)

En los ovarios de los animales denervados, los folículos sanos con diámetro menor a 350 μ m disminuyeron de manera significativa, no así los atrésicos (Figura 2)

Figura 2. Media \pm e.e.m del número total de folículos sanos o atrésicos, por ovario y por diámetro en los animales tratados con capsaicina o vehículo al nacimiento y sacrificadas al primer estro vaginal



* $P < 0.05$ vs Vh (prueba de kruskal Wallis)

DISCUSIÓN

Los resultados de este estudio nos permiten sugerir que la inervación sensorial del ovario participa en la modulación de los procesos neuroendócrinos centrales y periféricos que culminan con la pubertad.

El retraso en la edad de la apertura vaginal observado en los animales denervados es semejante a lo descrito por Traurig y col (1984). Este retraso puede ser explicado por la disminución en la tasa de crecimiento corporal en los animales con desnervación sensorial. Es bien sabido que el inicio de la pubertad está asociado directamente con los procesos metabólicos involucrados con el peso y talla del animal (Frisch 1980; Steiner y col 1983). Otra posibilidad es que la capacidad secretora de estrógenos por parte de los ovarios de los animales denervados sea menor que la de los grupos testigo o que este retrasada en el tiempo. Dado que el peso relativo del útero de los animales denervados fue similar al del grupo testigo y del inyectado con vehículo podemos suponer que la secreción de estrógenos en las ratas denervadas estuvo retrasada. La sección bilateral del nervio vago, en el cual el 95% de las fibras son de tipo sensorial provoca disminución en la actividad esteroidogénica del ovario ante el estímulo con hCG (Ojeda y col 1983). Sin embargo parece ser que los mecanismos de retroalimentación ejercido por los esteroides gonadales que culminan con la secreción de gonadotropinas necesarias para la ovulación no se modificaron ya que la proporción de animales que ovularon fue semejante a lo observado en las hembras tratadas con vehículo.

Traurig y col (1984) mostraron que la destrucción farmacológica de las fibras sensoriales no modifica la fertilización de los óvulos, sin embargo, se desconoce si hay alteraciones en el proceso ovulatorio. En el presente trabajo, la administración de capsaicina provocó disminución en el número de ovocitos liberados al primer estro vaginal. Estos resultados nos llevan a sugerir que la información sensorial estaría participando en la respuesta del folículo a las gonadotropinas, probablemente en colaboración con la innervación simpática.

Al momento, se han sumado las evidencias que muestran que puede haber una interrelación funcional entre la innervación simpática y la sensorial para regular el crecimiento de los folículos que van a culminar con la ovulación (Ojeda, 1997; Ojeda y Urbanski 1994). Lara y col (1990) administraron anticuerpos al factor de crecimiento neural (abNGF) y promovieron con esto la destrucción de las fibras simpáticas y sensoriales, que resultó en un aumento del número total de folículos, dado por los preantrales. Los autores proponen que la información que viaja por las fibras sensoriales estaría facilitando la comunicación intrafolicular.

La disminución en el número total de folículos observado en las ratas denervadas, pueden ser interpretada como una disminución de la respuesta del folículo a las gonadotropinas, probablemente asociado con la FSH, ya que la disminución se presentó sobre todo en los folículos en crecimiento. Esta disminución folicular podría indicar disminución en la actividad esteroidogénica (Greenwald y Roy 1994).

En conclusión nuestros resultados nos permiten sugerir que los componentes sensoriales del reflejo neuroendócrino que provoca la liberación de las gonadotropinas seguido de la liberación de los estrógenos, sería mediada por fibras primarias aferentes sensibles a la capsaicina. Adicionalmente estas fibras pudieran influenciar indirectamente a los órganos reproductivos con la liberación de sustancia P como un neurotransmisor de sinapsis.

BIBLIOGRAFÍA

- Ahmed C., Dees W. y Ojeda S. 1986. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP) containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinol* 118:1682-1689.
- Berkley K., Hotta H., Robbins A. y Sato Y. 1990. Functional Properties of afferent fibers supplying reproductive and other pelvic organs in pelvic nerve of female rat. *J Neurophysiol* 63(2):256-272.
- Brown R.E. 1994. An introduction to neuroendocrinology. Cambridge University Press. N.Y.
- Burden H.W., Lawrence I.E., Louis T.M. y Hodson C.A. 1981. Effects of abdominal vagotomy on the oestrous cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy. *Neuroendocrinol* 33:216-222.
- Burden W.H. 1985. The adrenergic innervation on mammalian ovaries. En: Catecholamines as hormone regulator. N Ben-Jonathan, J.M Bahr y R.I Weiner (Eds). Raven Press. N.Y.
- Cotton J., Traurig H., Papka R. 1983. Substance P and Vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in the female reproductive system. *Anat Rec* 205:38.
- Chávez R., Morales L., González M.E. y Domínguez R. 1994. Ovarian norepinephrine content in prepubertal rats with superior ovarian nerve section: Temporal studies. *Med. Sci. Res* 22:789-790.

- Dees W I, Ahmed C E, y Ojeda S R. 1986. Substance P and Vasoactive Intestinal Peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinol* 119:638-641.
- Frisch R. 1980. Pubertal adipose tissue. Is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Fed Proc* 39:2395-2400.
- Gamse R, Wax A., Zigmund R.E., y Leeman S.E. 1981. Immunoreactive substance P in sympathetic ganglia: distribution and sensitive towards capsaicin. *Neuroscience* 6:437-441.
- Greenwald G y Roy S. 1994. Follicular development and its control. En: The physiology of reproduction, segunda edición. E. Knobil y J.D. Neill (eds). Raven Press Ltd. New York. 629-724 pp.
- Gu J, Huang W., Islam K., Mc Gregor G., Terenghi G., Morrison J., Bloom S y Polak J. 1983. Substance P-containing nerves in the mammalian genitalia. En: Substance P. R. Skrabanek y D. Powell (eds). Boole Press Ltd. Dublin. 263-264 pp.
- Holzer P. 1991. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43(2):143-201.
- Jancsó G y Király E. 1981. Sensory neurotoxinas. Chemically induced selective destruction of primary sensory neurons. *Brain Res* 210:83-89.
- Kannisto P., Ekblad E., Helm G., Owman C.H., Sjöberg N.O., Stjernquist Sundler F y Wallis B. 1986. Existence and coexistence of peptides in nerves of mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histochem* 96:25-34.
- Klein C.M. y Burden H.W. 1988. Anatomical localisation of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett* 85:217-222.
- Kumazawa T. 1986. Sensory innervation of reproductive organs. *Progr Brain Res* 6:115-130.
- Lara H. E., Mc Donald J.K. y Ojeda S.R. 1990. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinol* 126(1):364-375.
- Lawrence I.E. Jr y Burden H.W. 1980. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *Anat Rec* 196:51-59.
- Lembeck F. y Gamse R. 1982. Substance P in peripheral sensory processes. En: Substance P in the nervous system. R. Porter y M. O'Connor (eds). Pitman Books Ltd. London. 35-49 pp.
- Luthman J., Strömberg I., Broding E. y Jonsson G. 1989. Capsaicin treatment to developing rats induces increase of noradrenaline levels in the iris without affecting the adrenergic terminal density. *International J Devel Neurosci* 0(0):000-000.
- Morales L. y Morán C. 1996. Efectos de la sección del nervio ovárico superior en la dinámica folicular e incidencia de atresia en el ovario de la rata juvenil. XXI reunion anula de la academia de investigación en biología de la Reproducción. AC. 26-29 de mayo Mazatlán, Sin.
- Ojeda S.R., White S.S., Aguado I.L., Advis J.P., Andersen J.M. 1983. Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat. *Neuroendocrinol* 36:261-267.
- Ojeda S., Urbanski F. y Ahmed C. 1986. The onset of female puberty: studies in the rat. Recent Progress in Hormone Research. Vol. 42. 382-442.
- Ojeda S. y Urbanski F. 1994. Puberty in the rat. En: The physiology of reproduction, segunda edición. E. Knobil y J.D. Neill (eds). Raven Press Ltd. New York. 363-409 pp.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

68

- Ojeda S.R. 1977 Control neuroendocrinotrófico del desarrollo de la función ovárica XV Reunion de la asociación latinoamericana de investigadores en reproducción humana 27-30 de abril, Cusco, Peru. S2:13.
- Steiner R., Cameron J., McNeill T., Clifton D. y Bremmer W. 1983 Metabolic signals for the onset of puberty En: Neuroendocrine aspects of reproduction R.L. Norman (ed) New York Academic Press 183-229 pp
- Traurig H., Cotton J., Papka R., Saria A. y Lembeck F. 1983 Substance P in the female reproductive system and the effects of capsaicin *Neuroscience Abst* 9:11
- Traurig H., Saria A. y Lembeck F. 1984 The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol*.

Trabajo apoyado por CONACYT IN 1719 DGAPA IN 208996 PUIS UNAM y PADEP

Letras



AIBIR
ACADEMIA DE INVESTIGACIÓN
EN BIOLOGÍA DE LA REPRODUCCIÓN, A.C.

Reunión Anual

XXV Aniversario

**14 al 17 de junio
2000**

Taxco, Gro.

**MESA DIRECTIVA
1999-2000**

PRESIDENTA

María Raquel Huerta Franco

VICEPRESIDENTE

José Miguel Betancourt Rule

SECRETARIA

Patricia Rosas Saucedo

PROSECRETARIO

Enrique Canchola Martínez

CONSEJEROS

Federico Martínez Montes

Ivone Castro Romero

EFFECTOS DE LA DESNERVACIÓN SENSORIAL SOBRE LA PUBERTAD

Carolina Morán* Rocío Selene Razo* Leticia Morales* y Roberto Domínguez*

RESUMEN

En la regulación de las funciones ováricas participan tanto las hormonas sintetizadas por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas como la inervación que recibe el ovario. La inervación sensorial, cuyo principal marcador bioquímico es la sustancia P, es uno de los componentes en la «traducción» de las señales ováricas por parte del sistema nervioso. En este trabajo analizamos los efectos de la denervación sensorial en la regulación de los mecanismos neurales involucrados en la pubertad de la rata. Se realizó la denervación sensorial aplicando capsaicina sc (50mg/Kg de pc) a ratas recién nacidas o de 72 horas de vida. Se evaluaron los siguientes parámetros: Edad de la apertura y del primer estro vaginal, número de ovocitos liberados, peso de órganos, número de folículos y concentración de hormonas esteroides. Comparadas con el grupo control, las ratas denervadas presentaron un retraso en la edad en que se presenta el primer estro vaginal (40.3±0.63 testigo absoluto; 45.7±0.90 capsaicina al nacimiento; 44.9±1.0 capsaicina a las 72 horas $p < 0.05$), sin que se modifique las concentraciones plasmáticas de estrógenos. El número de ovocitos liberados al primer estro fue significativamente menor sólo en las ratas denervadas al nacimiento (6.4±0.63 vs 8.0±0.42 $p < 0.05$) y coincide con una disminución en el número total de folículos (77.5±5.8 vs 124.6±4.7, $p < 0.05$). En los animales denervados a los tres días de edad, se observó aumento del total de folículos medidos (162.0±3.8 vs 124.6±4.7 $p < 0.05$). La denervación sensorial no modificó la concentración de progesterona. Estos resultados nos permiten sugerir que la inervación sensorial es uno de los componentes neurales entre el eje gónada-hipotálamo

Palabras clave: Denervación sensorial, inervación ovárica, capsaicina, pubertad, desarrollo folicular, hormonas esteroides

Agradecimientos

Este trabajo se realizó con el apoyo de PAEP, PAPIIT 293799 y de CONACYT 29006N

INTRODUCCIÓN

La inervación que llega al ovario participa directamente en el control del desarrollo folicular y la esteroidogénesis. Estas fibras son de naturaleza simpática y sensorial y llegan a las principales estructuras del ovario (vasculatura, tejido intersticial, folículos en desarrollo), a través del plexo ovárico del nervio ovárico superior y del vago (1, 2, 3).

Las fibras sensoriales se originan en los segmentos T9-T11 y L2-L4 de la médula espinal y arriban al órgano por el plexo ovárico, mientras que las fibras simpáticas se originan en los segmentos T11-L4 y arriban al ovario por el nervio ovárico superior. Las fibras sensoriales pueden ser reconocidas por la presencia de sustancia P (SP), péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP) entre otros (4, 5, 6, 7).

Existen evidencias experimentales que permiten suponer que existe una conexión neural bidireccional entre los ovarios y el sistema nervioso central. Estudios de marcaje transneuronal con el virus de la pseudorrabia inyectado en el ovario muestran que aparecen neuronas marcadas en el diencefalo y algunos núcleos hipotalámicos (8). En el animal hemicastrado el contenido de LHRH hipotalámico incrementa ipsilateral a la ovariectomía (9). La lesión unilateral del núcleo medial del rafe (10) o de la sustancia gris periacueductal (11) afectan la ovulación del ovario ipsilateral a la lesión. La inervación sensorial enviaría al sistema nervioso central (SNC) información rápida sobre el funcionamiento del ovario (12). En este contexto, las fibras sensoriales representarían las vías aferentes que informan sobre la sensibilidad y el estado individual del desarrollo folicular (13, 14).

* Laboratorio de Fisiología Reproductiva, Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción FES Zaragoza UNAM AP-S-020 CP 15000 México D.F. México

Para estudiar la participación de la información sensorial en la fisiología de diversos órganos, se ha utilizado a la capsaicina como un neurotóxico específico. Las neuronas que son afectadas por la aplicación de capsaicina son las sensoriales primarias, son peptidérgicas, de diámetro pequeño a mediano, no mielinizadas o con poca mielina (15, 16). La capsaicina actúa a través de la estimulación de un receptor de membrana específico, el cual ha sido localizado en neuronas aferentes primarias en los segmentos cervical torácico y lumbar (17).

En la rata, después de la aplicación de capsaicina (sistémica en la etapa neonatal o cuando se aplica de manera local en la etapa adulta) la cantidad de SP-immunoreactiva disminuye significativamente en los órganos reproductivos (18, 19).

La administración intratecal de capsaicina no tiene efectos en la duración del ciclo estral, la hipertrofia compensadora o el comportamiento sexual de la hembra. Sin embargo, los animales denervados mostraron una reducción significativa en la tasa de fertilidad, comparada con las ratas testigo (tratadas con vehículo o sin tratamiento) (20). Estos resultados llevan a sugerir que la falta de información sensorial reduce la capacidad de estimulación cervico-vaginal que desencadena la preñez.

Al parecer los efectos de la capsaicina sobre la regulación del ciclo estral, la ovulación y las funciones reproductivas dependen entre otros factores del inicio del tratamiento, de la dosis y la cepa del animal en estudio (15). La destrucción de neuronas primarias aferentes inducida por la administración neonatal de capsaicina, modificó el crecimiento corporal subsecuente, la maduración sexual y ciertos aspectos de las funciones reproductivas como una menor frecuencia de preñez y la mayoría de las hembras que quedan preñadas no llegan a término (18). Estos resultados permiten sugerir que los componentes sensoriales del reflejo neuroendócrino que interviene en la liberación de la LH y la prolactina hipofisaria, seguida a la estimulación mecánica por la cópula en la rata hembra, serían mediados por nervios sensoriales sensibles a la capsaicina.

La foliculogénesis en la rata se inicia cerca de la médula región que contiene la mayor parte de la inervación. La detección inmunohistoquímica de estas fibras se ha realizado en ovarios fetales antes de que se inicie la foliculogénesis y ya para los tres días de nacidas existe un número importante de folículos (19), hechos que llevan a pensar en la existencia de una estrecha relación entre la presencia de las fibras y la foliculogénesis.

Para analizar la participación de la información sensorial en los mecanismos que modulan el inicio de la pubertad de la hembra se estudiaron los efectos del tratamiento con capsaicina al nacimiento o a las 72 horas de vida sobre el crecimiento folicular y la concentración de hormonas esteroides.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras recién nacidas de la cepa C11-ZV, mantenidas en condiciones controladas de iluminación 14 horas de luz (05:00 a 19:00) y 10 de obscuridad y temperatura ambiente. Al nacimiento las camadas fueron sexadas y se mantuvieron 5 hembras y un macho por caja. Las crías permanecieron con la madre hasta el día 21 de edad y a partir de este momento tuvieron libre acceso al agua y alimento. Todos los animales fueron pesados una vez por semana en una balanza con sensibilidad de 0.1 g. Al nacimiento o al tercer día de vida los animales fueron asignados al azar en alguno de los siguientes grupos experimentales.

Ratas recién nacidas o de tres días de edad fueron inyectadas una sola vez por vía subcutánea con 50mg/Kg de peso corporal de capsaicina (derivado de la Vanillilamida 8-metil-N-Vanillil-6-nonenamida, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO, USA). El fármaco se disolvió en una solución de etanol (10 ml), Tween 80 (10 ml) solución salina (80 ml). También se contó con un grupo inyectado con vehículo y otro que no recibió tratamiento al cual llamamos testigo absoluto.

Todas las ratas fueron revisadas diariamente a partir de los 20 días de edad. Al momento en que se presentó la canalización de la vagina se inició la toma de frotis vaginales y los animales fueron sacrificados cuando la citología vaginal correspondió a un estro típico.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Se colectó la sangre del tronco, la que se dejó coagular a temperatura ambiente durante 15 minutos, se centrifugó a 3500 rpm y el suero se almacenó a -20°C hasta la cuantificación de hormonas esteroides. La cuantificación de 17 β -estradiol y progesterona se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando estuches comerciales (Coat-A-Count Los Angeles CA EE UU).

A la autopsia se diseccionaron los oviductos donde se buscó la presencia de ovocitos, los que fueron contados con la ayuda de un microscopio estereoscópico. Se diseccionaron y pesaron en balanza de precisión los ovarios y el útero. Los ovarios fueron fijados en líquido de Bouin incluidos en parafina se realizaron cortes seriados de 10 μ m que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Los folículos fueron clasificados en sanos o atrésicos; se consideró a un folículo atrésico si éste presentaba al menos una de las siguientes características: picnosis nuclear de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa engrosamiento de las capas celulares de la teca o alteración del ovocito.

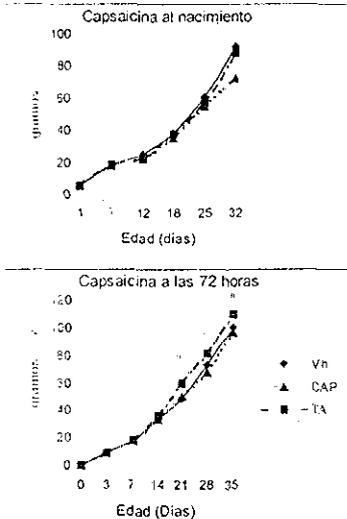
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

La edad de apertura vaginal, del primer estro del número de ovocitos liberados y de folículos, fueron analizadas por la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn. El peso corporal, de los ovarios, útero y la concentración sérica de hormonas esteroides se analizaron por una prueba de análisis de varianza multifactorial (ANDEVA), seguida por la prueba de Tukey. La tasa ovulatoria (definida como el número de animales ovulantes/número total de animales tratados) se analizó por la prueba de probabilidad exacta de Fisher o de χ^2 . En todos los casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas aquellas cuya probabilidad fue menor o igual al 0.05.

RESULTADOS

No se observaron diferencias significativas en el peso corporal de los animales tratados con vehículo y los testigos. En los animales tratados con capsaicina al nacimiento el peso corporal hasta los 25 días de edad, fue semejante al testigo y fue menor a los 32 días. En comparación el grupo testigo absoluto, los animales denervados a las 72 horas de nacidos, la disminución del peso corporal se observó a partir de los 21 días de edad (Figura 1).



♦ $p < 0.05$ vs vehículo (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey) * $p < 0.05$ vs Testigo absoluto (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey)

En las hembras tratadas al nacimiento con capsaicina, la edad de apertura vaginal y del primer estro se retrasó significativamente comparado con los animales tratados con vehículo. El porcentaje de animales denervados que ovularon al primer estro fue similar que el grupo testigo o tratado con vehículo, mientras que el número de ovocitos liberados por ambos ovarios fue significativamente menor que el de los animales testigo absoluto o tratados con vehículo (Tabla 1).

Tabla 1. Tasa de animales ovulantes (número de animales ovulantes/número total) media \pm e.e.m. de la edad de apertura vaginal, primer estro y del número de ovocitos liberados por ambos ovarios de ratas Testigo absoluto o tratadas al nacimiento con Vehículo o Capsaicina.

	n	edad de apertura vaginal	edad de primer estro	tasa de animales ovulantes	número de ovocitos
Testigo absoluto	20	39.3 \pm 0.49	40.3 \pm 0.63	69	8.0 \pm 0.42
Vehículo	11	37.6 \pm 0.20*	38.5 \pm 0.38	95	9.0 \pm 0.30
Capsaicina	22	40.5 \pm 0.36*	45.7 \pm 0.90*♦	83.5	6.4 \pm 0.63*♦

♦ $p < 0.05$ vs vehículo (Prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn)
* $p < 0.05$ vs testigo absoluto (Prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn)

En las hembras tratadas con capsaicina a las 72 horas de edad, la edad de apertura vaginal y primer estro se retrasó significativamente comparado con los animales testigo absoluto. No se observaron diferencias significativas en la tasa de animales ovulantes así como el número de ovocitos liberados por ambos ovarios (Tabla 2).

Tabla 2. Tasa de animales ovulantes (número de animales ovulantes/número total) media \pm e.e.m. de la edad de apertura vaginal, primer estro y del número de ovocitos liberados por ambos ovarios de ratas Testigo absoluto o tratadas a las 72 hrs de nacidos con Vehículo o Capsaicina.

	n	edad de apertura vaginal	edad de primer estro	tasa de animales ovulantes	número de ovocitos
Testigo absoluto	20	39.3 \pm 0.49	40.3 \pm 0.63	69	8.0 \pm 0.42
Vehículo	23	42.9 \pm 0.94*	44.0 \pm 0.82*	68	7.3 \pm 0.70
Capsaicina	29	42.8 \pm 0.95*	44.9 \pm 1.00*	76	7.2 \pm 0.67

* $p < 0.05$ vs testigo absoluto (Prueba de U de Mann-Whitney seguida por Dunn)

En los animales tratados con capsaicina al nacimiento así como en los denervados a las 72 horas de nacidos no se modificaron las concentraciones séricas de estradiol o progesterona (Tabla 3).

Tabla 3. Media \pm e.e.m. de la concentración sérica de estradiol (E2) y progesterona (P4) de ratas Testigo absoluto o tratadas al nacimiento o a las 72 horas de nacidos con Vehículo o Capsaicina.

	Al nacimiento		a las 72 horas	
	P4 (ng/ml)	E2 (pg/ml)	P4 (ng/ml)	E2 (pg/ml)
Testigo absoluto	5.4 \pm 1.10	20.3 \pm 1.51	5.4 \pm 1.10	20.3 \pm 1.51
Vehículo	5.7 \pm 2.50	29.4 \pm 3.40	6.7 \pm 0.92	25.0 \pm 4.89
Capsaicina	6.1 \pm 2.50	35.2 \pm 7.8	4.0 \pm 0.63	13.3 \pm 1.64

En los animales denervados al nacimiento el peso relativo de la masa ovárica aumentó significativamente con respecto a los animales testigo mientras que el peso del útero no se modificó (Tabla 4)

La denervación sensorial al nacimiento disminuyó significativamente el número total de folículos y el porcentaje de folículos sanos, aunque ésta no llegó a ser estadísticamente significativa (Tabla 4)

Tabla 4. Medias ± e. m. de la masa ovárica, del útero y del número total de folículos y porcentaje de folículos sanos de ratas Testigo absoluto o tratadas al nacimiento con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal

	Masa ovárica mg/100 g pc	Útero mg/100 g pc	Número total de folículos	% folículos sanos
Testigo absoluto	30.6 ± 1.94	136.0 ± 6.57	124.6 ± 4.7	62.0
Vehículo	29.2 ± 1.40	140.1 ± 4.60	140.0 ± 3.36	66.9
Capsaicina	36.8 ± 1.40*	152.1 ± 6.80	77.5 ± 5.8 †	40.8

* p < 0.05 vs. testigo absoluto o vehículo (ANDEVA, seguida por Tukey)

† p < 0.05 vs. testigo absoluto o vehículo (Kruskal-Wallis, seguida por Dunn)

En los animales denervados a las 72 horas de nacidos hay un aumento en el número total de folículos en comparación con los animales testigo y el porcentaje de folículos sanos no se vio afectado por la denervación sensorial. En estos animales denervados el peso relativo de la masa ovárica y el útero no se vieron afectados (Tabla 5)

Tabla 5. Medias ± e. m. de la masa ovárica, del útero y del número total de folículos y porcentaje de folículos sanos de ratas testigo absoluto o tratadas a las 72 horas de nacidas con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal

	Masa ovárica mg/100 g pc	Útero mg/100 g pc	Número total de folículos	% folículos sanos
Testigo absoluto	30.6 ± 1.94	136.0 ± 6.57	124.6 ± 4.7	62.0
Vehículo	28.8 ± 1.80	130.5 ± 5.71	189.7 ± 43.9	28.5
Capsaicina	31.1 ± 3.88	144.4 ± 8.10	162.0 ± 3.8*	39.0

* p < 0.05 vs. testigo absoluto (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de Dunn)

DISCUSIÓN

El retraso en el crecimiento corporal y en la edad de apertura vaginal y primer estro provocado por la denervación sensorial, nos lleva a sugerir que dicha información es necesaria para que se cierre el circuito que involucra la estimulación del SNC y modula el inicio de la pubertad

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que los efectos de la denervación sensorial dependen de la edad en la que se inducen. En los animales tratados al nacimiento el primer estro vaginal se presentó 120 a 144 horas después de la apertura vaginal, mientras que en los tratados en el día tres el estro vaginal se observó 72 horas después de la canalización vaginal. Según Carrillo y col. (20);

Holzer, (15) la inyección de capsaicina en la etapa neonatal no modifica el patrón de crecimiento corporal durante los primeros 27 días de vida. En nuestro estudio la denervación al nacimiento provocó retraso en el crecimiento a partir de los 32 días de edad, mientras que cuando la denervación se realizó a los 3 días de edad éste se presenta desde el día 21

El retraso en el inicio de la pubertad provocado por la eliminación de la información sensorial podría ser consecuencia de la disminución en el peso corporal que se observó previo a la pubertad. Estudios de Frisch (21), Steiner y col. (22) muestran que la edad en la que se produce la canalización de la vagina depende entre otros factores del peso y la talla del animal. Otra posible explicación es que la denervación sensorial de la vagina resulte en la disminución en la sensibilidad de ésta a los estrógenos, ya que en estos animales no se observaron cambios significativos en la concentración sérica de la hormona.

La disminución del número de folículos ováricos en los animales tratados con capsaicina al nacimiento, hecho que no ocurre cuando los animales fueron denervados en el día tres de vida (final de la etapa de la foliculogénesis), indica que la información sensorial que se genera en el ovario es indispensable para que se dé normalmente la foliculogénesis. Dicha inervación podría estar vinculada con la liberación de algún tipo de neurotrofina, tal y como ha sido propuesto por Dissen y col. (23). Según Malamed y col. (19) existe un periodo explosivo de diferenciación folicular que ocurre entre el día uno y dos de vida postnatal, y existen evidencias de que la foliculogénesis es un evento independiente de las gonadotropinas (24, 19)

La disminución en el número de ovocitos liberados en los animales tratados con capsaicina al nacimiento puede ser explicado por la disminución en el número de folículos observado en los ovarios. Esta disminución en el número de folículos podría ser consecuencia de la disminución de la concentración plasmática de gonadotropinas mostrada por Cotton y col. (25)

Según Sterne y col. (26), Luthman y col. (27), Farkas-Szallasi y col. (28) y Schicho y col. (29) la destrucción de las fibras sensoriales resulta en un aumento de las fibras simpáticas o parasimpáticas que secretan NPY o VIP. Los resultados de nuestro estudio abren la posibilidad de que exista un rearrreglo de los sistemas neurales del ovario lo que resulte en cambios en la secreción de neuropéptidos que tienen la capacidad de reducir el desarrollo folicular en combinación con la estimulación gonadotrópica

Tomados en conjunto los resultados del presente estudio y otros previos, postulamos que la inervación sensorial es uno de los componentes neurales entre el eje gónada-hipotálamo tal como ya ha sido propuesto previamente (1, 9, 12, 30)

BIBLIOGRAFÍA

- 1 Dissen GA y Ojeda SR. 1999. Ovarian innervation. En: *Encyclopedia of Reproduction*. Eds. E. Knobil and J Neill Academic Press San Diego Cal. EUA. 583-589 pc.
- 2 Burden HW. 1985. The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: *Catecholamines as hormone regulator*. N. Ben-Jonathan JM Bahar y RI Weiner (Eds) Raven Press, New York
- 3 Domínguez R. 1990. Differential ovulatory responses of the right and left ovaries of the adult rat to unilateral lesion and anaesthesia of the cervico vaginal pexus. *J Endocrinol* 124:43-45
- 4 Nance DM, Burns J, Klein CM y Burden HW. 1988. Afferent fibers in the reproductive system and pelvic viscera of female rats: Anterograde tracing and immunocytochemical studies. *Brain Res Bull* 21:701-709
- 5 Klein C M. y Burden H.W. 1988. Anatomical localisation of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neurosci Lett* 85:217-222.
- 6 Papka RE, Cotton JP, Traurig H. 1996. 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 Res.*, 242: 475-490.
- 7 McNeill DL y Burden HW. 1987. Neuropeptides in sensory perikarya projecting to the rat ovary. *Am J Anat* 179:269-276
- 8 Lee y col 1996. Soc. Neurosci. Abstr. 22:1576.
- 9 Gerendai I y Halász B. 1997. Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinol* 18:354-381.
- 10 Ayala ME, Rosas P y Domínguez R. 1993. Different effects on unilateral and bilateral lesion of the dorsal rafe nucleus on puberty and first ovulation. *Brain Res Bull* 34:27-30
- 11 Domínguez-González A y Chávez R. 1994. Evidence for participation of the catecholaminergic system of the midbrain central gray matter on ovulation: a lateralised study. *Med Sci Res.* 22:311-312
- 12 Domínguez R y Riboni I. 1971. Failure in ovulation in hemisphered autografted ovary. *Neuroendocrinology* 7:164-170
- 13 Lara H E., Mc Donald J.K. Ahmed C.E., Ojeda S.R. 1990. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology* 127:2199-2209.
- 14 Kannisto P, Ekblom e HelmG Owman Ch, Sjöberg NO, Stjernquist y col. 1986. Existence and coexistence of peptides in nerves of the mammalian ovary and oviduct demonstrated by immunocytochemistry. *Histochemistry* 86:25-34
- 15 Holzer P. 1991. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* 43(2):144-189
- 16 Szallasi A. 1994. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. *Gen Pharmac* 25(2): 223-243.
- 17 Wardle KA, Ranson J y Sanger G.J. 1997. Pharmacological characterization of the vanilloid receptor in the rat dorsal spinal cord. *British J of Pharmacol.* 121:1012-1016.
- 18 Traurig H, Saria A, y Lembeck, F. 1984. The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:254-259.19. Cotton J., Traurig H. y Papka R. 1983. Substance P and vasoactive intestinal polipeptide-immunoreactive nerves in the female reproductive system. *Anatomical Record* 205:38-39.
- 20 Nance DM, King TR y 1987. Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats. *Brain Res Bull* 18:109-114
- 21 Frisch R. 1980. Pubertal adipose tissue: is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Fed. Proc* 39:2395-2400.
- 22 Steiner R., Cameron J, McNeill T, Clifton D, y Bremner W. 1983. Metabolic signal for the onset of puberty. En: *Neuroendocrine aspects of reproduction*. R.L Norman (ed) New York: Academic Press. 183-229
- 23 Dissen GA, Malamed S., Gibney JA, Hirshfield AN., Costa ME, y Ojeda SR. 1992. *Neurotrophins are required for follicular formation in the mammalian*. *Soc Neurosci Abs* 18:463-10.
- 24 Peters H., Byskov A.G., Lintern-Moore S., Faber M, Y Anseren M. 1973. The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J Reprod Fertil* 35:139-141.
- 25 Cotton J., Traurig H., Papka R., Rush M. y Jones H. 1985. Effects of capsaicin treatment on periovulatory LH and FSH surges in rats. *Anat Rec* 211:45A-46A
- 26 Sterne GD, Brown RA., Green CJ, y Terenghi G. 1998. NT-3 modulates NPY expression in primary sensory neurons following peripheral nerve injury. *J Anat* 193:273-281.
- 27 Luthman J., Strömberg I., Broding E y Jonsson G. 1989. Capsaicin treatment to developing rats induces increase of noradrenaline levels in the iris without affecting the adrenergic terminal density. *International Journal of Developing Neuroscience* 7(6):613-622.
- 28 Farkas-Szallasi T., Lundberg J.M., Wiesenfeld-Hallin Z., Hökfelt T. y Szallasi A. 1995. Increased levels of GMAP, VIP and nitric oxide synthase, and their mRNAs in lumbar dorsal root ganglia of the rat following systemic resiniferatoxin treatment. *Neuro Report* 6:2230-2234
- 29 Schicho R., Kanai Y, Ishikawa T., Skofitsch G. y Donnerer J. 1998. Involvement of NGF in the induction of increased noradrenergic innervation of ureter in neonatally capsaicin-treated rats. *J Anat Nervous System*: 73-46-53
- 30 Domínguez R., Cruz ME y Chávez R. 1989. Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian En Growth factors and the ovary. AN Hirshfield (Ed) *Serono symposia plenum Press* NY 321-325 pp



SOCIEDAD MEXICANA
DE CIENCIAS
FISIOLÓGICAS, A. C.
Y
ASOCIACIÓN LATINOAMERICANA
DE CIENCIAS FISIOLÓGICAS.

**XLIII CONGRESO NACIONAL
XX CONGRESO LATINOAMERICANO.**

Del 3 al 7 de septiembre del 2000.

**Programa General
y Resúmenes**

**Hotel Fiesta Americana Coral Beach
Cancún, Quintana Roo, México, 2000.**

EFFECTOS DE LA INYECCIÓN DE CAPSAICINA (CAP) AL NACIMIENTO SOBRE EL OVARIO DE LA RATA PREPÚBER. Morán, C. Morales L., Quiróz, U., Chavira R. y Domínguez, R. Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, FES Zaragoza UNAM. México

El ovario recibe inervación simpática, parasimpática y sensorial, las cuales participan en el control de sus funciones. Las terminales nerviosas aferentes, que tienen a la sustancia P (SP) como principal neurotransmisor, están asociadas a la vasculatura y a los folículos en desarrollo. La administración de SP no modifica la secreción de esteroides ováricos, aunque la eliminación de las fibras sensoriales provoca alteraciones en el crecimiento del folículo. Por ello en este estudio se analizaron los efectos de la denervación sensorial producida por la inyección de CAP (50 mg/kg.) s.c. a ratas recién nacidas, sobre la concentración sérica de estradiol (E_2) y progesterona (P_4), la de noradrenalina (NA) ovárica y los pesos de los órganos en animales sacrificados a los 20, 24, 28 y 32 días de edad. En los animales sacrificados a los 32 días de edad la denervación resultó en la disminución del peso corporal (77.6±2.6 vs. 90±2.2) la masa ovárica (22.6±1.6 vs. 25.6±1.8), el útero (45.1±3.5 vs. 82.3±7.9) y la concentración de P_4 (2.3±0.5 vs. 12.5±2.3). Cuando los animales denervados fueron sacrificados a los 28 días, las concentraciones de E_2 y P_4 fueron menores (E_2 : 13.6±1.1 vs. 22.1±2.4; P_4 : 4.1±1.5 vs. 12.7±2.4) En los animales denervados sacrificados a los 24 días la concentración de P_4 fue mayor (6.5±1.1 vs. 1.6±0.1). La concentración de NA ovárica sólo incrementó en los animales denervados sacrificados a los 24 días (0.87±0.07 vs. 0.61±0.05). Estos resultados nos permiten sugerir que durante el desarrollo prepupal de la rata la información sensorial participa en la regulación de la secreción de las hormonas ováricas

Trabajo apoyado por CONACyT 29006-N y DGAPA IN203799

EFFECTOS DE LA LESIÓN BILATERAL DE LA ZONA INCERTA MEDIAL SOBRE EL CICLO ESTRAL Y LA OVULACIÓN ESPONTÁNEA DE LA RATA. Morán, J. L., Ramírez, E., Meléndez, E., Coronel, I. & Méndez, A.* Laboratorio de Investigaciones Biológicas ICUAP Puebla.

En la rata, las áreas preóptica e hipotalámica anterior (POA-AHA) desempeñan un papel crucial en el control de la secreción preovulatoria de la GnRH y las gonadotropinas. En este control, el sistema dopaminérgico desempeña aparentemente un papel de tipo estimulante, ya que el bloqueo farmacológico del sistema dopaminérgico del hipotálamo anterior inhibe la ovulación e interrumpe el ciclo estral. Gran parte de la dopamina que llega a POA-AHA se proyecta desde la zona incerta medial (ZIm) del tálamo. Se cree que la ZIm es un sitio de la acción *feedback* estimulante de los esteroides ováricos ya que su destrucción suprime el pico preovulatorio de la LH y de la prolactina, aunque no se afecta el de la FSH. Con el fin de analizar el papel de la ZIm sobre el ciclo estral y la ovulación, a ratas con ciclos estrales regulares de cuatro días se les lesionó la ZIm por microinyección de ácido kaínico (1 µg/µl x lado x 5 min.) en el día del estro. Al grupo testigo se les perfundió sólo el vehículo. Los animales fueron sacrificados en la mañana del estro vaginal: 1) luego de tres ciclos consecutivos de igual duración ó, 2) luego de 25 días después de la operación. La lesión bilateral de la ZIm no afectó la ovulación espontánea pero sí alteró significativamente la ciclicidad de los animales. Los resultados de las frecuencias de recuperación de ciclos estrales regulares (FCER) y los días de duración del primer ciclo estral después de la cirugía y del total de días hasta el sacrificio se muestran a continuación.

Grupo	FCER	Días 1 ^{er} Ciclo	Días Totales
Testigo	9/10	4.7±0.4	20.7±2.0
Lesión de la ZIm	3/10*	8.8±1.3**	30.9±1.3**

* ** p<0.05 comparado con el grupo Testigo. (* X²; ** t de Student).

Estos resultados muestran que la ZIm del tálamo participa de manera significativa en los mecanismos neurales y neuroendocrinos que regulan el ciclo estral. lo que nos permite sugerir que la dopamina es una señal crucial para que el ciclo estral y la secreción de gonadotropinas ocurran de manera adecuada.

Apoyado por CONACyT, convenio 2806-C y FOMES 99 22-14

ANÁLISIS CONDUCTUAL DE LA REPRODUCCIÓN EN VARIAS ESPECIES DE AVES MEXICANAS EN EL ZOOLOGICO DE SAN JUAN DE ARAGÓN. Vasconcelos-Dueñas, I. S.; Ista, D. G.; López, I.G. y Hernández, J.* * Zoológico de San Juan de Aragón, México, D. F. UAM Iztapalapa, Departamento de Biología de la Reproducción C. B. S. México DF

La actividad reproductora en los seres vivos, está determinada genéticamente; y puede alterarse por factores exógenos. En aves que viven en cautiverio, se ha demostrado que la luz, es el factor exógeno que afecta más significativamente dicha función. Con el objetivo de analizar si algunas de las especies de aves silvestres conservan su modalidad específica de reproducción viviendo en condiciones de cautiverio, se realizaron observaciones de la conducta que presentan antes, durante y después del cortejo en ejemplares del águila real ó dorada (*Aquila chrysaetos*), en la tucaneta ó tucanillo verde (*Aulacorhynchus prasinus*), en un grupo de las Cara-cara común (*Polyborus plancus*) y en vaquitos sitaciformes como la guaca maya verde (*Ara milleris*), y de el loro occidental (*Amazona finschi*), entre otros. Las observaciones se realizaron de febrero a principio de junio de 1999, con una duración promedio variable, regulada por el porcentaje de visitantes; iniciándose siempre a las 7:30 am; cesando de 9:30 y 11:00 hrs continuas. La información se anotaba en tablas especialmente diseñadas para ello. Se logró captar y analizar varias de las fases y conductas típicas del cortejo en las aves, como son: la diferenciación del plumaje el roce de los picos, las vocalizaciones, las llamadas de apareo y el baile en los ejemplares antes citados. En el caso de las águilas, también se observó la selección del sitio y material usado para la construcción del nido; en las guacamayas también se pudo captar parte de esa misma actividad. En ninguno de los casos se pudo observar la cópula. Todas estas especies de aves mexicanas, presentaron un patrón etológico del cortejo muy similar. Se puede concluir que en las Cara-cara, las manifestaciones conductuales observadas, fueron reforzantes de la jerarquía y de los lazos sociales que existen entre los miembros del grupo de esa jata; la importancia de conservar y de reproducir a algunas de las especies mexicanas en peligro, (registradas en la NOM - 059- ECOL - 1994); y de valorar la importancia real que tienen los Zoológicos como una alternativa para

REGULACIÓN ASIMÉTRICA DE LA AMÍGDALA MEDIAL SOBRE LA FUNCIÓN OVÁRICA EN RATA. Mercado C. R.* y Sánchez-Ramos M. A. Laboratorio de Fisiología Facultad de Ciencias Naturales Universidad Autónoma de Querétaro

Se ha comprobado que además de existir una modulación neuroendocrina por parte de la amígdala sobre los ovarios también existe una vía nerviosa que regula de forma asimétrica la ovulación. La lesión en la amígdala medial derecha en el diestro 1, disminuye significativamente el número de ovocitos liberados en el ovario izquierdo, mientras que la lesión en la amígdala medial izquierda no tiene ningún efecto sobre la ovulación. Además se ha reportado que sólo la deafferentación derecha del lóbulo temporal en ratas hembras hemicestradas reduce significativamente la respuesta de hipertrofia compensatoria ovárica².

El objetivo de este trabajo fue analizar los efectos que tiene la lesión unilateral de la amígdala medial sobre la ovulación y la secreción hormonal ovárica (progesterona y estradiol) en los días Proestro y Estro del ciclo estral de la rata.

Se utilizaron ratas hembras de la cepa wistar mantenidas en ciclo luz-oscuridad, con libre acceso al agua y al alimento. Los animales se lesionaron unilateralmente en la amígdala medial en el día diestro 1 y se dejó que recuperaran el ciclo estral. Posteriormente se sacrificaron en los días del Proestro y Estro. Se cuantificó el número de ovocitos liberados de ambos ovarios en las ratas sacrificadas en el Estro. Se colectó el plasma para la cuantificación hormonal y se extrajeron las gónadas para la observación histológica.

La lesión unilateral en la amígdala medial en el diestro 1 tiene un efecto asimétrico sobre la ovulación. La lesión derecha disminuye significativamente el número de ovocitos liberados en el ovario izquierdo 2 ± 0; y aumenta el número en el ovario derecho 9.2 ± 1.5 (animales intactos: izquierdo 6.8 ± 1.2; derecho 7.3 ± 1.5). La lesión izquierda no altera la ovulación en ninguno de los ovarios (izquierdo 6.8 ± 1.7; derecho 6.1 ± 0.98). En el día del Estro no se encontraron diferencias significativas en las concentraciones hormonales entre animales intactos y los lesionados en el lado izquierdo, pero con la lesión derecha las concentraciones de estradiol aumentaron significativamente (intactos 42.06 ± 9.16 ng/ml; lesión izquierda 43.2 ± 10.7 ng/ml; lesión derecha 57.8 ± 12.01 ng/ml). Con estos resultados se sugiere que la respuesta a la lesión en la amígdala medial derecha sí repercute de forma asimétrica a la funcionalidad ovárica (ovulación y secreción de esteroides) y por lo tanto se propone que la regulación asimétrica nerviosa de la amígdala hacia los ovarios no sólo afecta a la liberación de ovocitos sino también a la actividad de las células secretoras de estrógeno en el ovario.

Apoyado por el CONACyT 29107-N y FOMES 982302 y 992304

Sánchez, M. A. and R. Domínguez. Differential effects of unilateral lesions in the medial amygdala on spontaneous and induced ovulation. *Behav. Brain Res.* 1995 38: 313-317
 *González, I., Za, Caba, Z., Vokó and V. Cisneros. Effect of unilateral deafferentation in the medial basal portion of the temporal lobe on the hypophysio-ovarian axis in rats. An age-dependent lateralized control mechanism. *Brain Res.* 1990 519: 173-179



ACADEMIA DE INVESTIGACION
EN BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION, A.C.

XXVI REUNION ANUAL

Acapulco, Guerrero
23 - 26 de mayo de 2001

PRESIDENTE
Miguel Betancourt Rule

VICEPRESIDENTIA
Marta Romano Pardo

SECRETARIO
Enrique Canchola Martínez

PROSECRETARIA
Margarita González del Pliego Olivares

CONSEJEROS
Gabriela Morali de la Brena
Alberto Kably Ambe

EFECTOS DE LA DENERVACIÓN SENSORIAL INDUCIDA POR LA ADMINISTRACIÓN DE CAPSAICINA AL NACIMIENTO, SOBRE LA ESTEROIDOGÉNESIS Y EL DESARROLLO FOLICULAR DURANTE LA ETAPA JUVENIL DE LA RATA.

Carolina Morán, Leticia Morales, Roberto Chavira y Roberto Domínguez

Laboratorio de Fisiología Reproductiva, UIBR FES Zaragoza UNAM
Laboratorio de Investigaciones Biológicas del Instituto de Ciencias de la BUAP
Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán

INTRODUCCIÓN

Las funciones del ovario son reguladas tanto por las hormonas hipotalámicas e hipofisarias como por señales neurales directas. La inervación simpática aportada por el plexo ovárico y el nervio ovárico superior, liberan al interior de la glándula una serie de neurotransmisores entre los que se encuentran la noradrenalina (NA) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP), los que han sido presentados como reguladores de la esteroidogénesis y el desarrollo folicular temprano (Dissen y col 1993, Hsueh y col 1994, Mayerhofer y col 1997). En el ovario además coexisten otros tipos de inervación; la parasimpática y la sensorial.

Las fibras sensoriales que arriban al ovario presentan características similares a las que inervan otros órganos viscerales; tienen como péptidos marcadores a la sustancia P (SP), al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y al VIP; tienen soma pequeño y las fibras tienen muy poca o no presentan mielina (Holzer 1991). Las fibras sensoriales que se localizan en el ovario, se originan en los segmentos T9-T11 y L2-L4 de la médula espinal y arriban al órgano por el plexo ovárico (Nance y col 1988, Klein y Burden 1988, Papka y col 1996, McNeill y Burden 1987).

El que el ovario obtenga inervación motora del sistema simpático y del parasimpático (a través del nervio vago) y adicionalmente posea fibras aferentes que viajan por rutas simpáticas y vagales, sugiere la existencia de un eje neural ovario-hipotálamo el cual pudiera estar involucrado en el control de las funciones del órgano. De las evidencias funcionales que apoyan esta hipótesis, se encuentran los trabajos del grupo de Gerendai (1995, 1997, 2000), quienes al hacer hemiovariectomías observan en el hipotálamo incremento unilateral en el contenido del factor liberador de las gonadotropinas. Adicionalmente, las lesiones unilaterales en el hipotálamo, en áreas extrahipotálamicas, en la médula espinal o la sección del nervio vago, modifican algunas funciones ováricas. Advis y col. (1989), mostraron que a ratas inmaduras hipofisectomizadas a las que se les lesiona el lado izquierdo del área preóptica anterior del hipotálamo, presentan incremento significativo en la concentración de VIP intra-ovárico.

Las evidencias morfológicas obtenidas la mayoría de ellas por estudios de marcaje transneuronal, indican que las vías por las que la información sensorial de los órganos reproductores es llevada al sistema nervioso central, es a través de los nervios sensoriales que terminan en el cuerpo de la raíz dorsal y la sustancia gris intermedia. Una parte de la información aferente es liberada vía el tracto espino-solitario al núcleo del tracto solitario de la parte caudal de la base del cerebro y a

través del núcleo gracilis. El Núcleo del tracto solitario proyecta, en parte al núcleo paraventricular y al supraóptico, núcleos que están relacionados en la regulación de algunos procesos reproductivos (Collins y col 1999)

Similar a lo que sucede en otros órganos inervados por fibras simpáticas, parasimpáticas o sensoriales, el factor de crecimiento neural (NGF) es producido en el ovario y transportado retrógradamente desde el botón terminal hasta el soma neuronal donde funciona como factor de supervivencia. El receptor de baja afinidad al NGF y a otras neurotrofinas se encuentran presentes en el ovario de la rata desde la etapa fetal (Dissen y col 1991). Posterior al nacimiento, ocurre la foliculogénesis cerca de la médula, región que contiene la mayor parte de la inervación y en la que en algunas especies de mamíferos, incluyendo a la rata Wistar y algunos primates, presentan neuronas intrínsecas (D'Albora y col 2000). Cuando se inyecta el anticuerpo al NGF a ratas recién nacidas, se retrasa la pubertad, se presentan irregularidades en el ciclo estrol y se retrasa el crecimiento folicular. Estas evidencias han permitido proponer a los autores que la inervación sensorial pudiera servir como una vía de comunicación entre los folículos (Lara y col 1990).

Tomado en cuenta además que al momento en que se lleva a cabo la foliculogénesis aún no hay receptores a las gonadotropinas pero sí fibras nerviosas; se ha sugerido que la inervación del ovario contribuye a la adquisición de receptores a las gonadotropinas por parte de los folículos y de esta manera modular el desarrollo de los folículos (Dissen y col 1992)

Dado que tanto la inervación simpática y sensorial son dependientes del NGF y que aparentemente la viabilidad del factor en los tejidos es limitada, la denervación quirúrgica o la administración de neurotóxicos específicos, modifica la disponibilidad del factor neural en la inervación que queda intacta (Schicho y col 1998). Así, la denervación simpática provoca incremento en la densidad de las terminales nerviosas sensoriales, esto se ha observado en el sistema cardiovascular, el tracto urogenital y los ganglios simpáticos (Aberdeen y col 1990). Por otra parte, cuando se realiza la denervación sensorial por la administración de capsaicina la hiperinervación simpática se presenta en las arterias mesentéricas (Ralevic y col 1995), el iris y la cavidad oral (Terenghi y col 1986)

Para estudiar la participación de la información sensorial en la fisiología de diversos órganos, se ha utilizado a la capsaicina como un neurotóxico específico que actúa a través de la estimulación de un receptor de membrana el cual ha sido localizado en neuronas aferentes primarias en los segmentos cervical, torácico y lumbar (Holzer 1991, Szallazi 1994, Wardley y col 1997)

Según Nance y col (1987) "la administración intratecal de capsaicina a ratas adultas no tiene efectos en la duración del ciclo estrol, la hipertrofia compensadora o el comportamiento sexual de la hembra. Sin embargo, los animales denervados mostraron una reducción significativa en la tasa de fertilidad, comparada con las ratas testigo". Los autores sugieren que la falta de información sensorial reduce la capacidad de estimulación cervico-vaginal que desencadena la preñez

Estudios realizados por Traurig y col (1984) y por nuestro laboratorio, han mostrado que la administración de capsaicina en la etapa neonatal, además de modificar el crecimiento corporal

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

en la etapa peripuberal, induce retraso en el inicio de la pubertad reducción en el número de ovocitos liberados en el día del primer estro vaginal y del número de folículos en aproximadamente un 48%, este descenso se acompaña de un incremento significativo de la atresia (Morán y col 2000a) Estos resultados nos han permitido plantear el posible papel estimulador de la inervación sensorial sobre el desarrollo de los folículos, el cual estaría modulando dicho proceso desde la etapa en que se inicia la foliculogénesis. Y dado que es en la etapa juvenil en la que se da el mayor índice de crecimiento y diferenciación de los folículos en la rata, el propósito del presente trabajo fue estudiar los efectos de la denervación sensorial inducida al nacimiento por la administración de capsaicina, en los procesos de crecimiento y diferenciación del folículo ovárico, así como en la secreción de hormonas esteroides a lo largo de la etapa juvenil.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembras recién nacidas de la cepa C11-ZV mantenidas en condiciones controladas de iluminación 14 horas de luz (05:00 a 19:00) y 10 de oscuridad y temperatura ambiente. Al nacimiento las camadas fueron sexadas y se mantuvieron 5 hembras y un macho por caja. Las crías permanecieron con la madre hasta el día 21 de edad, y a partir de este momento tuvieron libre acceso al agua y alimento. Al nacimiento los animales fueron asignados al azar en alguno de los siguientes grupos experimentales:

a) Ratas recién nacidas fueron inyectadas una sola vez por vía subcutánea con 50mg/Kg de peso corporal de capsaicina (derivado de la Vanillilamida 8-metil-N-Vanillil-6-nonenamida, Sigma Chemical Co, St Louis, Mo USA) El fármaco se disolvió en una solución de etanol (10%), Tween 80 (10%) y solución salina (80%). b) Grupo inyectado con vehículo en el mismo volumen y c) otro que no recibió tratamiento, al cual llamamos testigo absoluto.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Los animales fueron sacrificados por decapitación a la edad de 20, 24, 28 ó 32 días de edad, previa toma de peso corporal. Se colectó la sangre del tronco, la que se dejó coagular a temperatura ambiente durante 15 minutos, se centrifugó a 3500 rpm y el suero se almacenó a -20° C hasta la cuantificación de hormonas esteroides. La cuantificación de 17β -estradiol y progesterona se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando estuches comerciales (Coat-A-Count, Los Angeles, Ca EE UU).

Se diseccionaron y pesaron en balanza de precisión los ovarios y el útero. Los ovarios fueron fijados en líquido de Bouin, incluidos en parafina, se realizaron cortes seriados de 10 μ m que fueron teñidos con hematoxilina-eosina. Los folículos fueron clasificados en sanos o atrésicos; se consideró a un folículo atrésico si éste presentaba al menos una de las siguientes características: picnosis nuclear de las células de la granulosa, descamación de las células de la granulosa, engrosamiento de las capas celulares de la teca o alteración del ovocito.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El peso corporal, de los ovarios, del útero, la concentración sérica de hormonas esteroides y el diámetro folicular promedio se analizaron por la prueba de análisis de varianza multifactorial.

(ANDEVA), seguida por la prueba de Tukey. El número de folículos fue analizado por la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de Dunn. En todos los casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas aquellas cuya probabilidad fue menor o igual al 0.05.

RESULTADOS

Experimento 1. Efectos de la administración sistémica de capsaicina al nacimiento sobre el peso corporal de los órganos y la esteroidogénesis durante el periodo juvenil.

El peso de los animales denervados y sacrificados a los 20 días de edad fue menor al de los animales inyectados con el vehículo, aunque no existe ninguna diferencia cuando se compara con el animal sin tratamiento. Sin embargo, a los 32 días de edad los animales denervados pesaron menos respecto a los animales inyectados con el vehículo y a los testigo absoluto (Tabla 1).

Tabla 1. Media \pm ecm del peso corporal en animales testigo absoluto, inyectados con vehículo o capsaicina al nacimiento. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad.

	20 días	24 días	28 días	32 días
Testigo absoluto	41.3 \pm 0.4	60.8 \pm 0.9	69.2 \pm 2.11	89.4 \pm 0.7
Vehículo	48.0 \pm 2.7 †	56.8 \pm 1.5	65.5 \pm 2.47	90.0 \pm 2.2
Capsaicina	40.1 \pm 0.9 *	58.6 \pm 1.8	61.6 \pm 3.7	77.6 \pm 2.6 *†

* P<0.05 vs vehículo (ANDEVA seguida de Tukey)

† P<0.05 vs Testigo absoluto (ANDEVA seguida de Tukey)

El peso de los ovarios de los animales denervados y sacrificados a los 32 días de edad fue significativamente menor al registrado en los animales testigo o inyectados con el vehículo, sin cambios en las demás edades (Tabla 2). El peso del útero de los animales denervados y sacrificados a los 32 días de edad se comporta de la misma manera (Tabla 3).

Tabla 2. Media \pm ecm de la masa ovárica en animales testigo absoluto, inyectados con vehículo o con capsaicina al nacimiento. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad.

	20 días	24 días	28 días	32 días
Testigo absoluto	19.9 \pm 0.4	23.9 \pm 1.6	28.7 \pm 2.4	30.6 \pm 2.8
Vehículo	16.8 \pm 2.4	19.1 \pm 0.8	25.5 \pm 1.5	25.6 \pm 1.8
Capsaicina	18.8 \pm 2.6	20.2 \pm 1.5	24.7 \pm 1.6	22.6 \pm 1.6 †

† P<0.05 vs Testigo absoluto (ANDEVA seguida de Tukey)

Tabla 3. Media \pm eem del **peso del útero** en animales testigo absoluto inyectados con vehículo o con capsaicina al nacimiento. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad

	20 días	24 días	28 días	32 días
Testigo absoluto	31.1 \pm 2.1	35.8 \pm 2.3	50.8 \pm 4.0	73.7 \pm 13.8
Vehículo	38.2 \pm 2.1	40.4 \pm 2.3	42.3 \pm 2.3	82.3 \pm 7.9
capsaicina	33.6 \pm 2.1	40.4 \pm 3.7	50.9 \pm 2.8	45.1 \pm 3.5 ^{*†}

* P<0.05 vs Vehículo (ANDEVA seguida de Tukey)

† P<0.05 vs Testigo absoluto (ANDEVA seguida de Tukey)

La concentración sérica de estradiol fue menor en los animales denervados y sacrificados a los 28 días de edad, con respecto a ambos grupos testigo. Mientras que la concentración de progesterona permaneció baja en las cuatro edades estudiadas siendo estadísticamente significativas de los 24 días de edad en adelante (Tabla 4)

Tabla 4. Media \pm eem de la concentración en suero de **estradiol y progesterona** en animales testigo o tratados con capsaicina o vehículo al nacimiento. Los animales fueron autopsiados a diferentes edades previas a la pubertad

	20 días	24 días	28 días	32 días
Estradiol (pg/ml)				
Testigo absoluto	22.4 \pm 3.2	31.6 \pm 6.8	20.7 \pm 2.3	16.5 \pm 4.7
Vehículo	20.9 \pm 3.9	16.0 \pm 1.6 [†]	22.1 \pm 2.4	23.7 \pm 2.6
Capsaicina	24.4 \pm 8.5	21.7 \pm 3.6	13.6 \pm 1.1 ^{**}	21.9 \pm 2.6
Progesterona (ng/ml)				
Testigo absoluto	6.6 \pm 1.4	10.9 \pm 0.4	10.7 \pm 2.3	12.8 \pm 1.8
Vehículo	6.8 \pm 1.3	10.6 \pm 0.1	12.7 \pm 2.4	12.5 \pm 2.3
Capsaicina	3.2 \pm 1.0	6.5 \pm 1.1 ^{*†}	4.1 \pm 1.5 ^{**}	2.3 \pm 0.5 ^{*†}

* P<0.05 vs Vehículo (ANDEVA seguida de Tukey)

† P<0.05 vs Testigo absoluto (ANDEVA seguida de Tukey)

Experimento 2. Estudio de los efectos de la administración sistémica de capsaicina al nacimiento sobre el crecimiento folicular durante la etapa juvenil.

En la figura 1 se presenta el diámetro promedio de todos los folículos medidos en el ovario de los animales asignados a cada uno de los tratamientos. El diámetro folicular promedio fue significativamente menor en los ovarios de los animales denervados al nacimiento y sacrificados

a los 20 y a los 28 días de edad, mientras que a los 32 días de edad se presentó un incremento en el diámetro folicular promedio

El número total de folículos contados en los ovarios de los animales testigo absoluto, inyectados con el vehículo o con la capsaicina y sacrificados a las diferentes edades se muestran en la figura 2. Los ovarios de los animales denervados al nacimiento y sacrificados a los 20 ó 28 días de edad, presentan un mayor número de folículos que los animales testigo absoluto y vehículo. Mientras que a los 24 y 32 días de edad no hay cambios.

A la edad de 20 y de 28 días de edad, se incrementa el número de folículos atrésicos, en tanto que a los 32 se presenta la misma tendencia sin llegar a ser estadísticamente significativa (Fig 3). El número de folículos sanos a los 28 días incrementa, mientras que a los 32 días de edad se da una disminución (Fig 4).

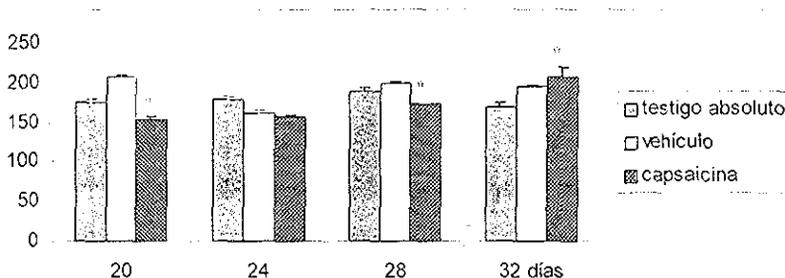


Fig. 1. Media \pm em del diámetro folicular promedio en el ovario de animales testigo absoluto o inyectados con vehículo o capsaicina al nacimiento. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades de la etapa infantil-juvenil. * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis seguida por Dunn)

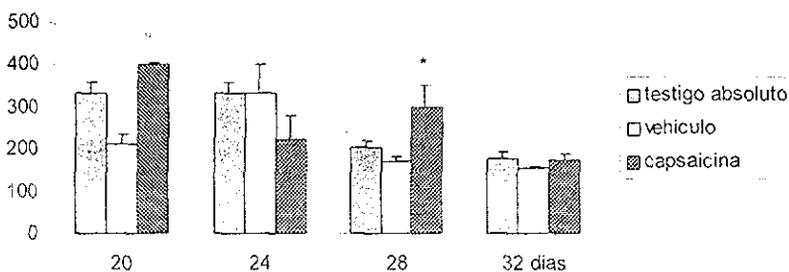


Fig. 2. Media \pm em del número total de folículos en el ovario de animales testigo absoluto o inyectados con vehículo o capsaicina al nacimiento. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades de la etapa infantil-juvenil. * $p < 0.05$ vs. Vehículo (Kruskal Wallis seguida por Dunn)

84

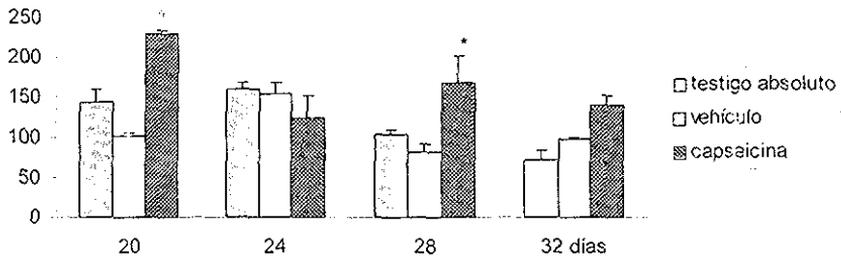


Fig. 3. Media \pm em del número de folículos atrésicos en el ovario de animales testigo absoluto o inyectados con vehículo o capsaicina al nacimiento. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades de la etapa infantil-juvenil * $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskall Wallis seguida por Dunn)

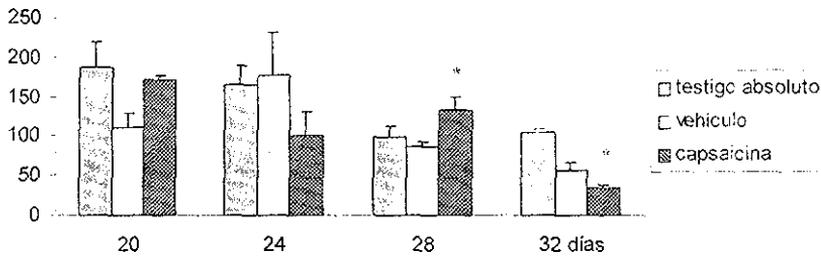


Fig.4. Media \pm em del número de folículos sanos en el ovario de animales testigo absoluto o inyectados con vehículo o capsaicina al nacimiento. Los animales fueron sacrificados a diferentes edades de la etapa infantil-juvenil * $p < 0.05$ vs Vehículo (Kruskall Wallis seguida por Dunn)

85

DISCUSIÓN

Los resultados del presente trabajo nos permiten sugerir que la inervación sensorial juega un papel regulador en el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico y en la esteroidogénesis. Se ha sugerido que la inervación sensorial obtiene información del funcionamiento del ovario a través de receptores ubicados alrededor de los folículos, la cual es enviada a centros hipotalámicos y extrahipotalámicos, que estarían involucrados en la regulación de la respuesta del folículo ovárico a las gonadotropinas (Domínguez y Riboni 1971, Burden 1978, Domínguez y col. 1989, Gerendai y col. 1995, Gerendai y col. 2000, Morán y col. 2000b).

La foliculogénesis en la rata es modulada, al menos parcialmente, por la inervación presente en la gónada (Malamed y col. 1992, Ojeda y Urbanski 1994). Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que al hacer la sección unilateral del nervio ovárico superior, que es el principal aporte de inervación simpática del ovario, se modifica el patrón de crecimiento folicular. Así, la sección a los 16 días de edad provoca aumento en el número de folículos presentes en las gónadas de hembras de 20 ó 28 días de edad, donde el 80 a 90 % de los folículos son atésicos (Morán y col., 2000b). En el presente trabajo, la eliminación de la información sensorial al nacimiento, induce aumento en el número total de folículos en ratas de 20 ó 28 días de edad, e incrementa el índice de atresia. Estos resultados nos permiten sugerir que la inervación sensorial tiene una participación dual en el funcionamiento del folículo ovárico. Por una parte, actúa de manera inhibitoria sobre el número de folículos que inician su crecimiento y por otra "frena" la atresia.

La inervación sensorial llega al ovario principalmente por el plexo ovárico, y es por este paquete de fibras que la gónada recibe NA y péptidos como la sustancia P y el VIP (Dissen y col. 1993, Ojeda y Urbanski 1994). Se ha postulado que tanto el VIP como la NA ejercen un papel facilitador sobre el crecimiento folicular a través de mecanismos acoplados al sistema de AMPc, el cual contribuye a la adquisición de receptores a FSH y de esta manera favorecen la supervivencia del folículo (Mayerhoffer y col. 1997). Otra alternativa es que estén participando en la respuesta del folículo a las gonadotropinas (Morales y col. 1998, Morán y col. 2000a). Estos antecedentes apoyarían la hipótesis de que la información que corre por las vías sensoriales participa inhibiendo la atresia folicular.

En las hembras denergadas al nacimiento y sacrificadas a los 32 días de edad, si bien no se modificó el número total de folículos sí aumentó la atresia y el diámetro promedio, es decir aumentaron los folículos antrales. En estudios previos (Morán y col. 2000a) mostramos que las hembras tratadas con capsaicina abren vagina alrededor de los 40 días de edad con una disminución en la cuota ovulatoria. Esto podría ser el resultado del aumento en la atresia de los folículos antrales que se observa días previos al inicio de la pubertad.

El ovario además de recibir la información sensorial por el plexo ovárico, presenta aferencias por el nervio vago (Gerendai y col. 2000), las que son capaces de modular las funciones ováricas (Burden y col. 1983, Lawrence y col. 1978). La mayoría de los efectos que resultan de la vagotomía (Ojeda y col. 1983, Nakamura y col. 1992, Burden y Lawrence 1977) son similares a los observados cuando se realiza la denergación sensorial por la administración de capsaicina (Apolonio 2000, Morán y col. 2000a): se retrasa la pubertad, se libera un número reducido de ovocitos e inhibe el desarrollo de la hipertrofia compensadora.

Los péptidos principales en las fibras sensoriales son la SP y el CGRP, varios autores han mostrado que estos no son capaces de alterar la secreción de esteroides *in vitro* (Ojeda y col 1985, Calka y col 1988). Sin embargo, en este trabajo mostramos que la concentración de progesterona en los animales denervados es menor en todas las edades estudiadas. Este comportamiento lo podemos explicar como una falta de estimulación por parte de las gonadotropinas sobre la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β -HSD) (Davoren y Hsueh 1985, Leung y Steele, 1992), hipótesis que es apoyada por los resultados del grupo de Cotton (1985), quienes observaron que en los animales denervados en la etapa neonatal, disminuyó la concentración de gonadotropinas séricas durante el periodo prepuberal. No podemos descartar que la alteración se da a nivel del propio ovario, es probable que ante la falta de información sensorial, en las células de la teca disminuyera la expresión de la P450_{scc} lo que se traduciría como una menor síntesis de progesterona.

La secreción de estradiol prácticamente no se modifica por la denervación sensorial. Sólo a los 28 días de edad se observó disminución de la hormona, lo que podría explicar porqué cuatro días posteriores disminuye el peso del útero. En conjunto, nuestros resultados nos permiten sugerir que la información sensorial es fundamental en los primeros pasos de biosíntesis de las hormonas esteroides a nivel de las células de la teca, pero al parecer la actividad de las células de la granulosa no se ve alterada.

A diferencia de lo reportado por otros autores quienes muestran que después de la denervación realizada a los dos días de vida se da una disminución en el peso corporal desde los 14 días de vida (Traurig y col 1984) o desde la tercera semana (Carrillo y col 1994); nuestros animales presentan disminución del peso corporal sólo a los 32 días de edad. Esta disminución de la masa corporal puede explicar el retraso de la edad en que se presenta el primer estro vaginal, ya que el inicio de la pubertad está asociado con procesos metabólicos relacionados con el peso y la talla de animal (Steiner y col 1983).

Del presente trabajo se desprende que la participación de la innervación sensorial en los procesos de crecimiento y diferenciación del folículo ovárico y la esteroidogénesis dependen del ambiente neuroendócrino del animal (Dominguez & Riboni 1971, Burden 1978, Domínguez y col 1989, Gerendai y col 2000, Morales y col 1998, Morán y col 2000a).

Trabajo apoyado por CONACyT 29006N y DGAPA-PAPIIT IN203799

BIBLIOGRAFÍA

- 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
- Advis JP, Ahmed CE y Ojeda SR 1989. Direct hypothalamic control of vasoactive intestinal polypeptide (VIP) levels in developing ovary. *Brain Res Bull* 22:605-610
- Apolonio J, Morales I y Domínguez R 2000. Efecto de la denervación sensorial sobre la hipertrofia compensadora del ovario. XLIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas XX Congreso Latinoamericano de Ciencias Fisiológicas. Can. Cun., Quintana Roo
- Burden HW y Lawrence II 1977. The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology* 23:368-378

- Burden HW 1978 Ovarian innervation. En: The vertebrate ovary: comparative biology RE Jones (Ed.) Plenum Press New York Cap 18, 616-638pp
- Burden HW, Leonard M, Smith CP y Lawrence IE 1983 The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *The anatomical Record* **207**:623-627
- Calka J, McDonald JK y Ojeda SR 1988. The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biology of Reproduction* **39**:1215-1223
- Carrillo P, Manzo J, Martínez-Gómez M, Salas M y Pacheco P 1994 Neonatal capsaicin administration: Effects on behavioural development of the rat. *Pharmacol Biochem Behav* **48**:447-452
- Collins JJ, Lin CE, Berthoud HR, y Papka RE 1999 Vagal afferents from the uterus and cervix provide direct connections to the brainstem. *Cell Tissue Res* **295**:43-54
- Cotton J, Traurig H, Papka R, Rush M y Jones H 1985. Effects of capsaicin treatment on periovulatory LH and FSH surges in rats. *Anat Rec* **211**:45A-46A
- Davoren JB y Hsueh AJW 1985 Vasoactive Intestinal Peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biol Reprod* **33**:37-52
- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Ma YI, y Ojeda SR 1991 Nerve Growth factor receptors in the peripubertal rat ovary. *Mol Endoc* **1**:1642-1650
- Dissen GA, Malamed S, Gibney JA, Hirshfield AN, Costa ME y Ojeda SR 1992 Neurotrophins are required for follicular formation in the mammalian. *Soc Neurosci Abs* **18**:463
- Dissen G, Dees WL, y Ojeda SR 1993 Neural and neurotrophic control of ovarian development. En: The ovary EY Adashi y Leung PCK (Eds) Raven Press, New York. 1-119
- Dominguez R y Riboni L 1971 Failure in ovulation in hemispayed autografted ovary. *Neuroendocrinology* **7**:164-170
- Dominguez R, Cruz ME y Chávez R 1989 Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian. En: Growth factors and the ovary AN Hirshfield (Ed) Sero symposia, Plenum Press, New York 321-325
- D'Albora H, Lombide P y Ojeda SR 2000 Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell Tissue Res* **300**:47-56
- Gerendai I, Csaba Zs, Vokó Z y Csernus V 1995 Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *J Steroid Biochem Molec Biol* **53**:299-305
- Gerendai I y Halász B. 1997 Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinol* **18**:354-381
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkői Z, Medveczky I y Halász B 2000 CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *J Auton Nerv Sys* **80**:40-45
- Holzer P 1991. Capsaicin: Cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacol Rev* **43**:144-189
- Hsueh AJW, Adashi EY, Jones PBC y Welsh TH Jr 1994 Hormonal regulation of the differentiation of cultured ovarian granulosa cells. *Endocr Rev* **5**:76-127
- Klein CM y Burden HW 1988 Anatomical localisation of afferent and postganglionic sympathetic neurones innervating the rat ovary. *Neurosci Lett* **85**:217-222
- Lara HE, McDonald JK y Ojeda SR 1990. Involvement of Nerve Growth factor in female sexual development. *Endocrinology* **126**:364-375
- Lawrence IE, Burden HW y Louis TM 1978 Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentration and fetal resorption. *J Reprod and Fertil* **53**:131-136

- Leung PC y Steele GL 1992. Intracellular Signaling in the gonads *Endocrine Reviews* 13:476-498
- Malamed S, Gibney JA y Ojeda SR 1992. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat *Cell and Tissue Research* 270:87-93
- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME y Ojeda SR 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* 138:3320-3329
- McNeill DL y Burden HW 1987. Neuropeptides in sensory perikarya projecting to the rat ovary *Am J Anat* 179:269-276
- Morales L, Chávez R, Ayala ME y Domínguez R 1998. Effects of the unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats, on the ovulatory response to gonadotrophins administration *J Endocrinol* 158:213-219
- Morán C, Razo SR, Morales L y Domínguez R 2000a. Efectos de la denervación sensorial sobre la pubertad. XXV reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A C. Taxco, Gro
- Morán C, Morales L, Quitóz U y Domínguez R 2000b. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth *J Endocrinol* 166:205-211
- Nance DM, King IR y Nance PW 1987. Neuroendocrine and behavioural effects of intrathecal capsaicin in adult female rats *Brain Res Bull* 18:109-114
- Nance DM, Burns J, Klein CM y Burden HW 1988. Afferent fibers in the reproductive system and pelvic viscera of female rats: Anterograde tracing and immunocytochemical studies *Brain Res Bull* 21:701-709
- Nakamura Y, Kato H, Terranova PF 1992. Abdominal vagotomy decreased the number of ova shed and serum progesterone levels in estrus in the cyclic hamster *Endocrinol Jpn* 39:141-145
- Ojeda SR, White SS, Aguado LI, Advis JP y Andersen JM 1983. Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat *Neuroendocrinology* 36:261-267
- Ojeda SR, Costa ME, Katz KH & Hersh LB 1985. Evidence for the existence of substance P in the pre-pubertal rat ovary I. Biochemical and physiological studies. *Biology of Reproduction* 33:286-295
- Ojeda SR y Urbanski HF 1994. Puberty in the rat. En: The physiology of Reproduction. Segunda Edición. E Knobil y JD Neill (Eds) Raven Press, New York 363-409
- Papka RE, Cotton JP y Traurig H 1996. 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 Res* 242:475-490
- Ralevic V, Karoon P y Burnstock G 1995. Long-term sensory denervation by neonatal capsaicin treatment augments sympathetic neurotransmission in rat mesenteric arteries by increasing levels of norepinephrine and selectively enhancing postjunctional actions *J Pharmacol Exp Ther* 274:64-71
- Schicho R, Kanai Y, Ishikawa I, Skofitsch G y Donnerer J 1998. Involvement of NGF in the induction of increased noradrenergic innervation of ureter in neonatally capsaicin-treated rats *J Anat Nervous System* 73:46-53

- Steiner R., Cameron J., McNeill T., Clifton D. y Bremner W. 1983 Metabolic signal for the onset of puberty. En: Neuroendocrine aspects of reproduction. R.L. Norman (ed) New York Academic Press 183-229
- Szallasi A. 1994. The vanilloid (capsaicin) receptor: receptor types and species differences. *Gen Pharmac* 25(2): 223-243
- Ierenghi G., Zhang S-Q, Unger WG y Polak JM 1986 Morphological changes of sensory CGRP-immunoreactive and sympathetic nerves in peripheral tissues following chronic denervation *Histochemistry* 86:89-95
- Traurig H., Saria A y Lembeck, F 1984 The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 327:254-259
- Wardle K.A., Ranson J y Sanger G J 1997 Pharmacological characterisation of the vanilloid receptor in the rat dorsal spinal cord *British J Pharmacol* 121:1012-1016