



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA**

**EFFECTO DE LA NEUROTOXICIDAD NORADRENÉRGICA DE N-2-CLOROETIL-N-ETIL-2-BROMOBENZALAMINA DURANTE EL DESARROLLO PREPUBERAL SOBRE LA PUBERTAD Y LAS FUNCIONES DEL OVARIO**

T e s i s

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**BIÓLOGA**

**PRESENTA:**

**Ana Laura Acevedo Martínez**

**Directora de tesis:** Dra. Juana Monroy Moreno

Investigación realizada gracias al Programa  
UNAM-DGAPA-PAPIIT, IA201012



**Ciudad de México,**

**2017**



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”**

Efecto de la neurotoxicidad noradrenérgica de N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzalamina durante el desarrollo prepuberal sobre la pubertad y las funciones del ovario

Tesis presentada por: Ana Laura Acevedo Martínez

Directora de tesis: Dra. Juana Monroy Moreno

Realizada en el Laboratorio de Neuroquímica de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, UNAM.

El presente estudio fue financiado por **DGAPA-PAPIIT IA201012**



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**

**“ZARAGOZA”**

**DIRECCIÓN**

**JEFE DE LA UNIDAD DE ADMINISTRACIÓN ESCOLAR  
P R E S E N T E.**

Comunico a usted que la alumna **ACEVEDO MARTÍNEZ ANA LAURA**, con número de cuenta **306218608**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **14 de febrero de 2017** a las **13:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

**PRESIDENTE** Dra. MARÍA ESTHER CRUZ BELTRÁN

**VOCAL** Dra. JUANA MONROY MORENO

**SECRETARIO** Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

**SUPLENTE** M. en C. MARISELA VALDÉS RUIZ

**SUPLENTE** Dra. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la neurotoxicidad noradrenérgica de N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzalamina durante el desarrollo prepuberal sobre la pubertad y las funciones del ovario.**

Opción de titulación: Tesis.

Agradeceré por anticipado su aceptación y hago propia la ocasión para saludarle.

**ATENTAMENTE**  
**“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”**  
 Ciudad de México, a 25 de noviembre de 2016

**DR. VÍCTOR MANUEL MENDOZA NÚÑEZ**  
**DIRECTOR**

**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES**  
**ZARAGOZA**  
**DIRECCIÓN**

RECIBÍ  
OFICINA DE EXÁMENES  
PROFESIONALES Y DE GRADO

VO. BO.  
M. en C. ARMANDO CERVANTES SANDOVAL  
JEFE DE CARRERA

## **Agradecimientos**

A la **Dra. Juana Monroy Moreno** por todo su apoyo, confianza y ayuda brindada para la elaboración de este trabajo.

A los miembros del jurado: **Dra. María Esther Cruz Beltrán, Dra. Juana Monroy Moreno, Dra. Patricia Rosas Saucedo, M. en C. Marisela Valdés Ruiz y Dra. María Elena Ayala Escobar** por todas sus aportaciones durante la revisión de este trabajo.

Al **Biól. Roberto Chavira**, del laboratorio de Hormona Esteroide del Instituto Nacional de Ciencias Medicas y Nutrición "Salvador Zubirán" por su colaboración en la realización de la técnica de radioinmunoanálisis.

A la **Sra. Dulce María** por su colaboración técnica en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción.

Al **personal del Bioterio** de la FES Zaragoza, por el cuidado a los animales utilizados durante este estudio.

Al **Dr. Manuel A. Castillo** por su orientación académica para la realización de las bases para el estadístico en NCSS.

Al **LDG. Alfredo** por su orientación académica para la edición de las figuras de este trabajo.

## Dedicatorias

A **mis padres (Ana y Irineo)**, por haberme fomentado el deseo de superación, compromiso y **apoyarme incondicionalmente**. A mi mamá, por tener las palabras de aliento cuando quería renunciar a mis sueños. A mi papá, por mostrarme que siempre debo luchar por mis objetivos y no hay nada imposible.

A **mis Hermanas (Mónica y Citlali)** por su apoyo, sus locuras y sobre todo por ser el **motor de mis triunfos**. A mi sobrino (**Angelo**) por cada sonrisa que me ayuda a ver lo hermoso de vivir cada momento.

A **Luis Guillermo** porque muchos de mis mejores momentos los he tenido a tu lado, lo bueno o malo siempre estás, **gracias por tu amor**, tus palabras de aliento y tus observaciones académicas que me ayudan a ser mejor.

A **mis Amigas** y compañeras (**Martha y Norma**) por ayudarme en la elaboración de este trabajo, por su amistad dentro y fuera del laboratorio, por los momentos compartidos. Gracias por **incorporarme a un gran equipo de trabajo**. A **Dieter** mi primer amigo de la Facultad, que compartimos tantos buenos momentos.

A mis **Amigos (Ángel y Lisandro)** por sus regaños y por todas esas pláticas que me ayudaban en tiempos difíciles. A todos mis amigos de la **FES ZARAGOZA**, la **BREM** que me enseñó *“convicción y disciplina es el eje de nuestro desarrollo”* y **CORENA (Mónica y Guadalupe)** por ayudarme a crecer tanto profesionalmente como personalmente.

**Gracias a todos, por ser parte de esta etapa.**

**Laura**

*“Cada descubrimiento abre un nuevo campo para la investigación de los hechos, nos muestra la imperfección de nuestras teorías. Se ha dicho oportunamente, que cuando mayor es el círculo de luz, mayor es el límite de la oscuridad de que está rodeado” Humphry Davy.*

## Índice

I. Resumen .....	1
II. Introducción.....	3
A.Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	5
B.Anatomía y función el sistema reproductor.....	9
C.Foliculogénesis.....	10
D.Esteroidogénesis.....	13
E.Regulación del inicio de la pubertad.....	16
F.Sistema noradrenérgico.....	17
G.Participación del sistema noradrenérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación.....	21
III. Justificación.....	26
IV. Hipótesis.....	27
V. Objetivo General.....	28
VI. Objetivos particulares .....	28
VII. Materiales y Métodos .....	29
A.Procedimiento de autopsia .....	29
B.Cuantificación de noradrenalina y su metabolito .....	30
C. Cuantificación de hormonas esteroides .....	31
C.1. Progesterona.....	32
C.2. Testosterona.....	32
C.3. Estradiol.....	32
D. Análisis estadístico.....	32
VIII. Resultados.....	33
A. Efectos de la administración de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida sobre la concentración de noradrenalina y del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil etilenglicol en el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios.....	33
A.1 Hipotálamo.....	33
A.2 Hipófisis.....	36
A.3 Ovarios.....	39
B. Efectos de la administración de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida sobre la edad de la apertura vaginal, del primer estro y la primera ovulación .....	41
C. Efectos de la administración de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida sobre la concentración sérica de progesterona, testosterona y 17 $\beta$ -estradiol .....	44
IX. Discusión .....	46
XI. Conclusiones .....	56
XII. Bibliografía .....	57

## I. Resumen

Se ha descrito que el sistema noradrenérgico en el animal adulto participa en los mecanismos que regulan el eje reproductivo hipotálamo-hipófisis-ovario, debido a que modulan la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de gonadotropinas, como consecuencia la ovulación y la secreción de las hormonas esteroides ováricas. Sin embargo, en el animal prepúber no es clara la participación de este sistema de neurotransmisión durante el desarrollo prepuberal. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la modificación del sistema noradrenérgico inducidos por la inyección de *N*-(2-cloroetil)-*N*-etil-2-bromobenzilamina (DSP<sub>4</sub>, neurotóxico selectivo de neuronas noradrenérgicas), durante el desarrollo prepuberal sobre el inicio de la pubertad (edad de la apertura vaginal [EAV] y del primer estro vaginal), la primera ovulación, la concentración de progesterona, testosterona, estradiol, y en los cambios en la concentración de noradrenalina y su metabolito el 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en el hipotálamo anterior y medio, la hipófisis y los ovarios.

En ratas hembra de recién nacidos (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad de la cepa CII-ZV, se les inyectó por vía intraperitoneal una dosis de 50 mg/kg de P.C. de DSP<sub>4</sub> o solución salina para cada edad propuesta. Los animales se sacrificaron en el día del primer estro vaginal, se contó el número de ovocitos liberados y se cuantificó la concentración de progesterona, testosterona y 17β-estradiol.

En los animales tratados con DSP<sub>4</sub> a la edad de 10d o 20d se retrasó la EAV (10d: 38.4±0.7 vs 35.2±0.5; 20d: 41.1±1.7 vs 38.0 ± 0.9, p<0.05). En la edad del primer estro se observó un mayor retraso en la edad de RN (RN: 44.4±1.0 vs 37.6±1.3, p<0.05), el número de ovocitos liberados fue menor en el grupo de animales tratados al día 20 (4.8±0.9 vs. 7.8±1.2, p<0.05). En ninguna de las edades tratadas con DSP<sub>4</sub> se modificó la tasa de animales ovulantes.

La concentración de 17β-estradiol, fue mayor en el grupo de animales tratados con DSP<sub>4</sub> al 10d (21.9± 2.6 vs. 14.5±1.3, p<0.05) o 20d (27.1± 3.1 vs. 20.5± 2.3, p<0.05).

En el hipotálamo anterior de los animales inyectados con DSP<sub>4</sub> a los 15 días de edad, fue menor la concentración de NA ( $0.7 \pm 0.1$  vs.  $1.8 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ ). La relación de [MHPG]/[NA] fue mayor en el grupo de animales tratados a los 15 días de edad ( $1.7 \pm 0.4$  vs.  $0.7 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ). En el hipotálamo medio no se observaron modificaciones en estos parámetros.

La concentración de NA fue menor en la hipófisis de los animales tratados con DSP<sub>4</sub> al nacimiento o al día 5 de edad (RN:  $0.3 \pm 0.1$  vs.  $1.2 \pm 0.3$ ,  $p < 0.05$ ; 5d:  $0.3 \pm 0.04$  vs.  $0.4 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ), mientras que la concentración de MHPG no se modificó independientemente de la edad en que se bloqueó el sistema noradrenérgico.

En los ovarios, la administración de DSP<sub>4</sub> no modificó la concentración de NA. En cambio la concentración de MHPG fue mayor en los animales inyectados con el neurotóxico al día 10 de edad ( $0.6 \pm 0.1$  vs.  $0.3 \pm 0.1$ ,  $p < 0.05$ ).

Con base en los resultados obtenidos en este estudio nos llevan a pensar que en el animal prepúber el sistema noradrenérgico ejerce un efecto diferencial en la regulación del inicio de la pubertad, ovulación y la esteroidogénesis. A los 10 de edad el sistema noradrenérgico participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad y la secreción de  $17\beta$ -estradiol, a los 20 días en el proceso de ovulación y no participa en dichos proceso al nacimiento, 5 o 15 días postnatal.

## II. Introducción

La pubertad es la etapa biológica que une la inmadurez con la madurez sexual, en la que se llevan a cabo cambios neuroendocrinos y fenotípicos que marcan el inicio de la actividad reproductiva (Muñoz y Román, 2011). Dichos procesos son resultado de cambios neuroendocrinos en el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que inician desde la etapa embrionaria y culminan con la pubertad (López y Charro, 1994). Además existen otros factores como la nutrición, los estímulos sociales y factores ambientales que influyen en dicho proceso (Adams y Steiner, 1988).

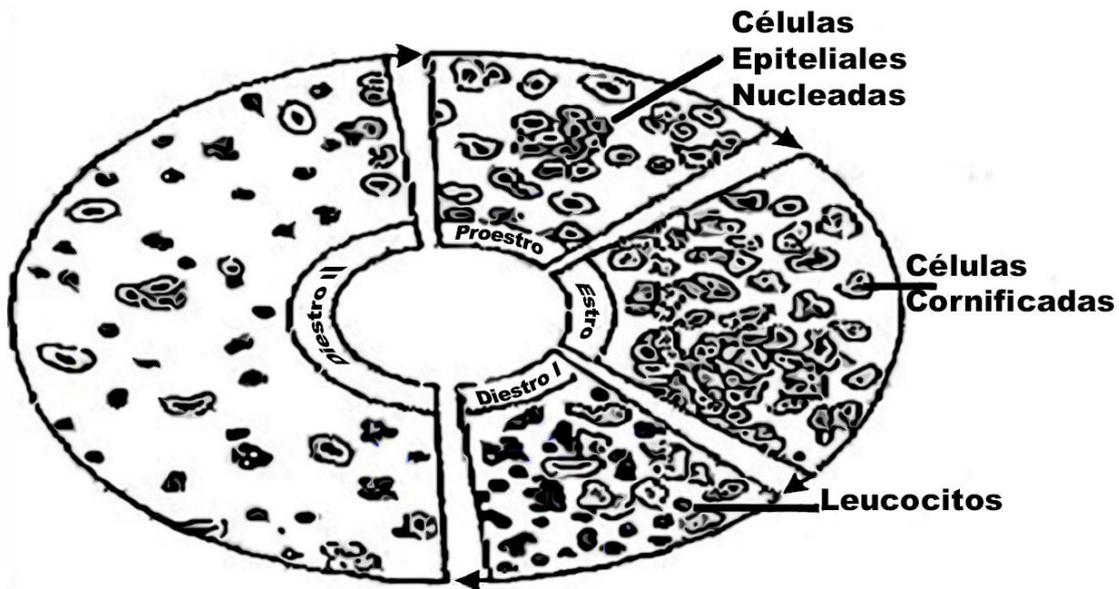
El desarrollo postnatal de la rata hembra se clasifica en cuatro etapas (Ojeda *et al.*, 1980), las cuales consideran parámetros morfológicos y fisiológicos:

- **Neonatal.** Etapa que abarca desde el nacimiento hasta los 7 días de vida, se caracteriza por la insensibilidad del ovario a las gonadotropinas. La concentración sérica de la hormona estimulante del folículo (FSH, por sus siglas en inglés) empieza a aumentar y la hormona luteinizante (LH, por sus siglas en inglés) se mantiene constante. El efecto de la retroalimentación que ejerce el estradiol en el eje hipotálamo-hipófisis no se establece debido a la mayor concentración plasmática de  $\alpha$ -feto proteína, esta se une a los estrógenos lo que provoca que sean inactivos. Al final de esta etapa se hace evidente la respuesta del ovario a las gonadotropinas, debido a que entre el cuarto y quinto día comienzan a formarse los receptores de la FSH y 48 horas después los de LH (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).
- **Infantil.** Se extiende del día 8 al 21 de vida. Se caracteriza por el aumento en la secreción de FSH, que alcanza su máxima concentración a los 12 días y disminuye a partir de día 15. El aumento de la FSH estimula el crecimiento de los folículos que van a llegar a ovular en la pubertad. A mediados de esta etapa se presentan elevaciones esporádicas de LH en la tarde, las que dejan de producirse al finalizar esta etapa y la disminuye la concentración de esta hormona. A los 10 días de edad, existen un mayor número de receptores a la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH, por sus siglas en inglés) y a las gonadotropinas (FSH y LH), teniendo una máxima sensibilidad hipofisaria. La máxima concentración de receptores a la GnRH coincide con la disminución de las concentraciones plasmáticas de la FSH, al disminuir el número de receptores a GnRH en el ovario

se estimula el proceso de esteroidogénesis. En las células de la granulosa sólo existen receptores a FSH y su número aumenta con la edad hasta el día 21, que marca el inicio del periodo juvenil (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Domínguez *et al.*, 1991).

- **Juvenil.** Inicia en el día 22 y finaliza a los 32 días de vida. A partir de esta etapa la concentración de FSH ha disminuido sensiblemente y en su comienzo las concentraciones de LH son bajas y constantes. La LH comienza a secretarse en forma pulsátil y hacia el final de esta etapa se incrementan sus valores basales y la amplitud de sus pulsos durante la tarde, estableciéndose un ritmo de secreción circadiano. En el ovario aumenta del número de receptores a LH, que con el patrón de secreción pulsátil de LH se traduce en una mayor esteroidogénesis (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).
- **Peripuberal.** Su duración es variable y culmina con la primera ovulación. Esta etapa se caracteriza por la maduración final del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El patrón circadiano de LH se establece regularmente, a este ritmo circadiano de LH, aparece minipicos de LH de dependencia esteroidea, lo que indica que la retroalimentación positiva de los estrógenos se ha establecido (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Como consecuencia de la retroalimentación estimulante, los estrógenos modulan la secreción de GnRH que se incrementa en los días previos a la pubertad y culmina con el pico preovulatorio de las gonadotropinas. La FSH y LH actúan en el ovario donde estimulan el crecimiento, la maduración final del folículo que culmina con la liberación del ovocito (ovulación) (Ramaley, 1979; Neill *et al.*, 2006).

En la hembra de los roedores la señal externa que evidencia el inicio de la pubertad es el rompimiento del epitelio que cubre la vagina, conocido como apertura vaginal, esta respuesta es inducida por la estimulación estrogénica. En la rata, este evento se presenta entre los 35 y 45 días después del nacimiento. La citología vaginal de los animales en este momento presenta características de proestro (células epiteliales nucleadas), estro (células cornificadas) o diestro (leucocitos) (Figura 1). La primera ovulación se presenta alrededor de las 24, 48 o 72 horas posteriores a la canalización vaginal (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski 1994, Monroy 1999).



**Figura 1.** El ciclo estral de la rata, dura entre cuatro y cinco días, cada etapa se caracteriza por la presencia de un tipo celular. (Tomado de Fernández-Guasti y Picazo, 1992).

Los procesos fisiológicos que se desarrollan durante la madurez sexual son regulados por la interrelación de mecanismos neuroendocrinos, que se llevan a cabo en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. El hipotálamo y la hipófisis forman una unidad funcional vital en la coordinación de los procesos que conllevan al establecimiento de la actividad reproductiva (Geneser, 2000).

### **A. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario**

El hipotálamo es el centro integrador esencial en la supervivencia de un organismo y la especie. Cada región del sistema nervioso central comunica con el hipotálamo y está sujeto a su influencia. Además, esta región comunica con los órganos periféricos mediante señales endocrinas y responde a sus estímulos aferentes (Yen *et al.*, 2001).

El hipotálamo se localiza en la base del diencefalo limitado por el tálamo en la región dorsal, en la posterior por los cuerpos mamilares y en la anterior por la lámina *terminalis*. El quiasma óptico y el tercer ventrículo divide al hipotálamo bilateralmente (Clifton y Steiner, 2009). Se describen entre 18 y 25 núcleos en el hipotálamo, que con base en su distribución se divide en tres regiones: lateral, medial, y periventricular. La

zona lateral es considerada como el relevo donde se establecen conexiones que salen del hipotálamo y son recibidas en las estructuras encefálicas más rostrales. La zona medial y periventricular contienen la mayor parte de las estructuras y los sistemas de fibras relacionados con la regulación central del sistema endocrino (Yen *et al.*, 2001; Toledano, 2005).

El hipotálamo es el centro que regula la síntesis y liberación de las gonadotropinas por medio de la GnRH. En la rata, las neuronas productoras de la GnRH están agrupadas en redes laxas y dispersas, que se localizan en el área preóptica, los núcleos preóptico medial, anterior y arcuato, proyectan sus axones hacia la eminencia media (Silverman *et al.*, 1987; Yen *et al.*, 2001).

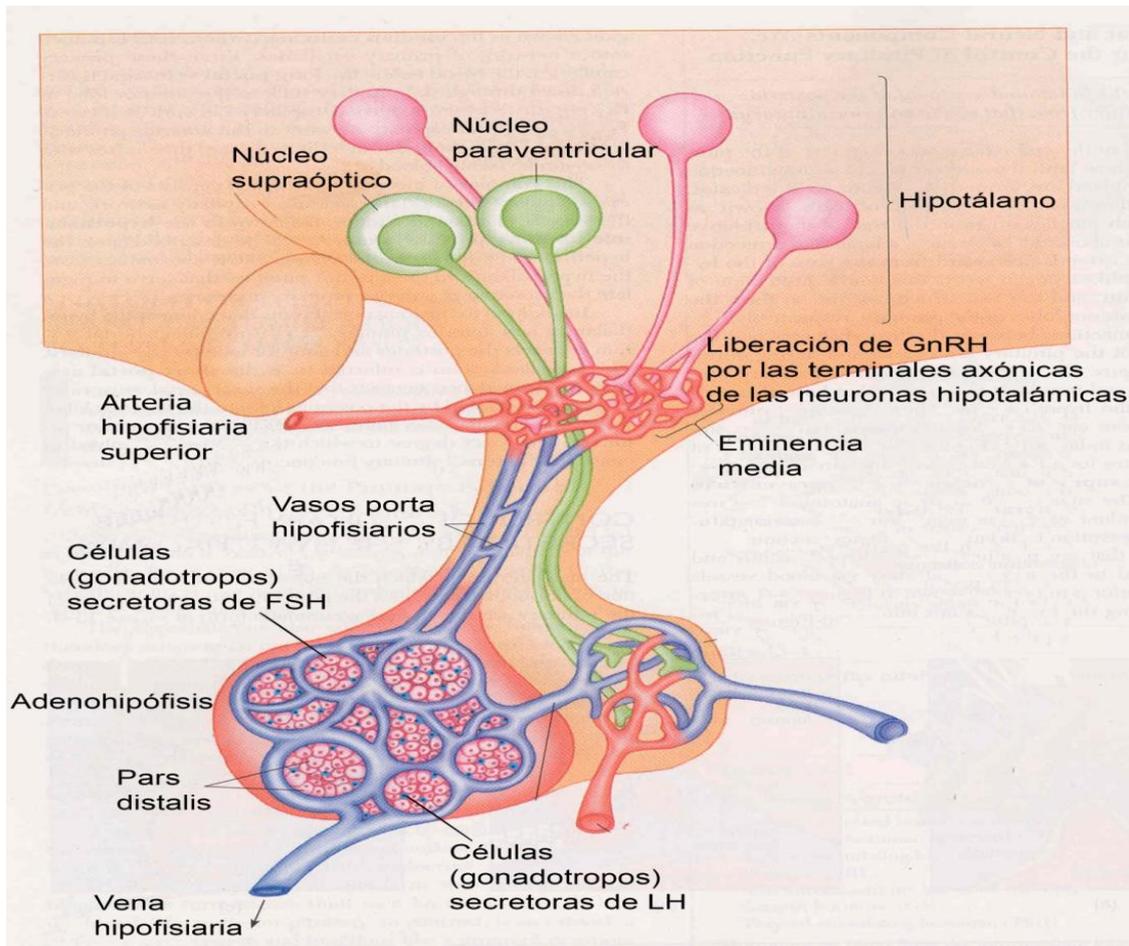
La GnRH es un decapeptido que se sintetiza como parte de una molécula de 92 aminoácidos llamada prepro-GnRH. El decapeptido es precedido por un péptido señal de 23 aminoácidos y seguido por una secuencia de tres aminoácidos (glicina-lisina-arginina), esenciales en el procesamiento proteolítico y la amidación del C terminal de la molécula de GnRH. El último residuo de 56 aminoácidos se conoce como péptido asociado con la GnRH (GAP, con propiedades inhibitorias sobre la secreción de prolactina). La preproGnRH se internaliza en el retículo endoplásmico y el péptido señal es cortado por acción de la endoproteasa PC2, dando origen a la pro-GnRH, que se transfiere al aparato de Golgi, dándose la ruptura de la cadena por la reacción proteolítica que elimina dos aminoácidos básicos, lisina-arginina, separando así a la GnRH de la GAP. La GnRH es activada mediante la ciclización enzimática de la glutamina N-terminal, la ruptura del enlace glicina<sup>11</sup>-glicina<sup>10</sup> y la amidación de la glicina en el carbono terminal. Posteriormente la GnRH y GAP son almacenadas en vesículas secretoras que son transportadas desde el soma a la terminal nerviosa por transporte axonal, que es liberada en respuesta a un cambio en el potencial de membrana por la entrada de calcio extracelular a través de canales de calcio dependientes de voltaje (Charli *et al.*, 1991; Yen *et al.*, 2001).

Las neuronas GnRHérgicas proyectan sus axones hacia la eminencia media (EM) donde es liberada en forma pulsátil al sistema vascular portal hipofisario (Figura 2). Las fibras nerviosas de estas neuronas también se proyectan hacia el sistema límbico, la amígdala, el hipocampo y la sustancia gris periacuedactal (Yen *et al.*, 2001).

La secreción pulsátil de GnRH es el resultado de un generador de pulsos (secreción en forma de descargas agudas, rítmicas y de corta duración) con una frecuencia aproximada de 60 minutos en el hipotálamo fetal y de 60 a 90 minutos en el adulto (Yen *et al.*, 2001).

El hipotálamo tiene conexiones vasculares con el lóbulo anterior de la hipófisis o adenohipófisis. En esta, se encuentran los gonadotropos, células productoras de las gonotropinas: FSH y LH, que son liberadas al torrente sanguíneo y al llegar al ovario se unen a sus receptores específicos de alta afinidad (localizados en las células de la teca y de las células de la granulosa) y estimulan la producción de los gametos (ovocitos) y la secreción de hormonas proteicas (activina y inhibina) y esteroides (progesterona, testosterona y estrógenos) (Silverman *et al.*, 1987; Geneser, 2000; Yen *et al.*, 2001).

La inhibina sintetizada en las células granulosas del ovario y liberada en la circulación, ejerce su efecto directamente en el gonadotropo, donde inhibe la secreción de FSH, y disminuye la amplitud del pulso de LH. La inhibina en combinación con el estradiol ejercen una acción de retroalimentación negativa en la secreción de FSH (Pargés y Aller, 2006).



**Figura 2. Eje hipotálamo-hipófisis, relación de las neuronas GnRHérgicas y los gonotropos. LH: hormona luteinizante; FSH: hormona estimulante del folículo (modificado de Tresguerres, 2003).**

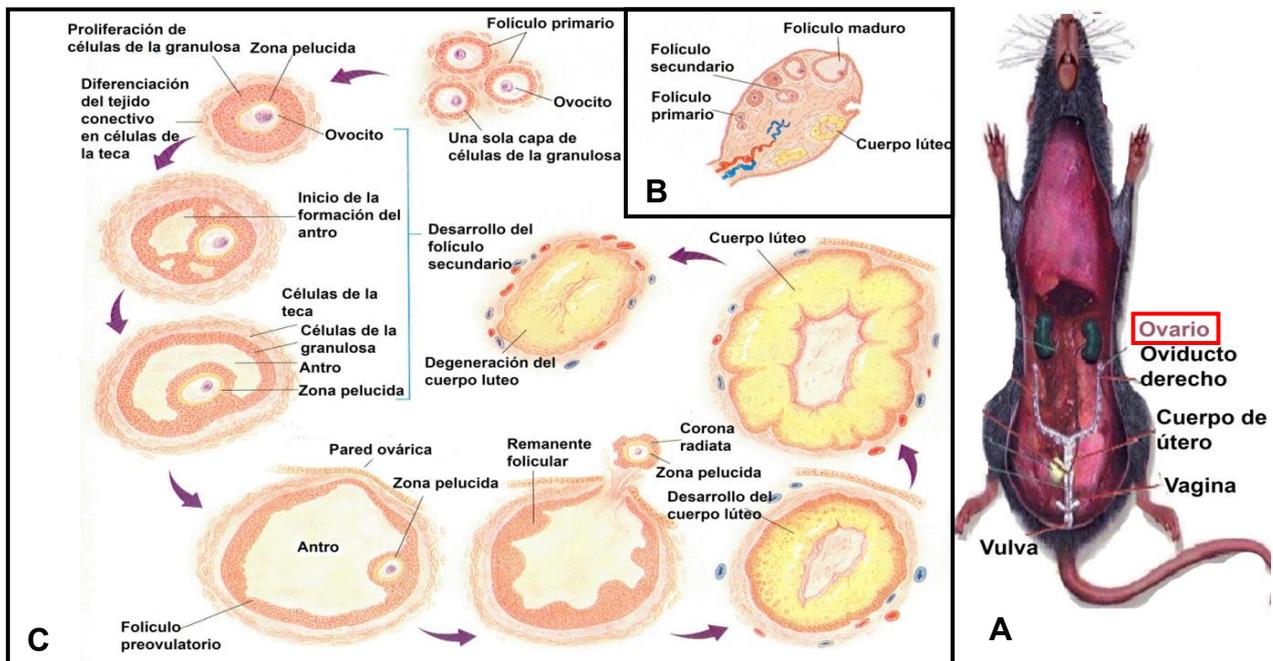
La secreción de GnRH es regulada por un doble control: el hormonal y el nervioso. La regulación hormonal se realiza por mecanismos neuroendocrinos vía las hormonas proteicas y esteroides que modulan el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. A nivel nervioso comprende la regulación de la actividad de las neuronas GnRH por otras regiones del SNC (corteza, sistema límbico, núcleo *Locus Coeruleus*, etc.) vía la liberación de neurotransmisores como noradrenalina, dopamina, serotonina, ácido  $\gamma$ -aminobutírico, péptidos opioides y aminoácidos excitadores o por modificaciones en las células gliales (Sawyer *et al.* 1947; Herbison, 1997; Yen *et al.*, 2001; Martins-Afféri *et al.*, 2003; Ojeda, 2006).

## B. Anatomía y función el sistema reproductor

El sistema reproductor lo conforman los ovarios, oviductos, el útero y la vaginal (Figura 3). En los ovarios se realiza la generación de ovocitos y de la producción de hormonas esteroideas (progesterona, testosterona y estradiol) y peptídicas (activina y inhibina) que mantienen los caracteres secundarios (González, 2010).

Los ovarios están compuestos por dos regiones: la médula y la corteza. La **médula** o región medular, está formada por tejido conectivo laxo con abundantes vasos sanguíneos, vías linfáticas y fibras nerviosas. La **corteza** o región cortical, está ubicada en la periferia del ovario y rodea a la médula, posee a los folículos ováricos incluidos en un estroma de tejido conectivo. El límite entre la corteza y la médula no es claro (Ross, 2008).

El folículo ovárico, estructura básica anatómica-funcional del ovario, está compuesto por dos tipos celulares separados por una membrana basal: las células de la teca, situadas en la periferia y las células de la granulosa, ubicadas dentro del folículo y en contacto con el ovocito (González, 2010).



**Figura 3. A) Anatomía del tracto reproductor de la rata hembra. B) Detalle del ovario y sus estructuras C) Desarrollo Folicular (Tomado y modificado de González, 2010).**

### C. Foliculogénesis

La formación del ovocito inicia en la etapa embrionaria, cuando cientos de células germinales migran desde el surco urogenital a la gónada primitiva, se diferencian a ovogonias y proliferan por división mitótica. Cuando la división mitótica cesa, las ovogonias entran en meiosis y se transforman en ovocitos primarios, que quedan detenidos en profase de la primera división meiótica (Gonzales, 2010). La transformación de los folículos primordiales hasta el estadio de folículos maduros se conoce como foliculogénesis (Pagés y Aller, 2006). Los folículos formados en la vida fetal se denominan folículos primordiales y consisten de un ovocito rodeado por una capa de células foliculares planas, que se ubica dentro de la lámina basal, su diámetro aproximado es de 30 a 60  $\mu\text{m}$  y contiene un ovocito diploide entre 9-25  $\mu\text{m}$  (Lintern-Moore *et al.*, 1974; Hirshfield, 1991; Pages y Aller, 2006).

A intervalos regulares durante la vida fetal, prepuberal y adulta una cohorte de folículos primordiales comienza a madurar espontáneamente. Las células foliculares que rodean al ovocito cambian su morfología de planas a cúbicas y dan origen a las células de la granulosa (Wassarman *et al.*, 1996). Estas células comienzan a secretar glicoproteínas y forman una capa traslúcida, denominada zona pelúcida, que rodea al folículo (Figura 3), formándose el folículo primario (Ross, 2008).

Las células de la granulosa continúan dividiéndose y forman un estrato; las células del estroma ovárico se condensan alrededor del folículo formando una pared, la teca que comienza a vascularizarse. En este punto, los folículos secundarios o preantrales producen esteroides al estímulo de las gonadotrofinas. La maduración folicular es regulada por las gonadotrofinas de forma cíclica (Ross, 2008; Gonzales, 2010).

En condiciones fisiológicas, los vasos sanguíneos de la teca nunca atraviesan la lámina basal que separa las células tecales de las células de la granulosa que no poseen irrigación y solo acceden a ellas luego de la ovulación, cuando el folículo se transforma en cuerpo lúteo (Pagés y Aller, 2006).

Los folículos preantrales se dirige a la muerte celular o atresia, a menos que sean rescatados por factores de sobrevivencia. A la LH y FSH son consideradas como dos factores de sobrevivencia folicular, que cuando aquellos folículos llegan al estadio preantral y coincide con una mayor concentración circulante de estas hormonas los

folículos continúan con su desarrollo y diferenciación. Luego de la aparición del antro folicular, las células de la granulosa se diferencian funcionalmente de acuerdo a su localización dentro del folículo. Las células más cercanas a la membrana basal o mural, tienen mayor capacidad de síntesis de esteroides debido a que expresan receptores a LH en una etapa temprana (Zoller y Weisz, 1978; Pagés y Aller, 2006).

El estradiol en las células de la granulosa promueve la aparición de nuevos receptores a FSH, lo que aumenta la sensibilidad del folículo a esta hormona e induce el crecimiento folicular. Durante esta etapa folicular, la FSH regula la reproducción de inhibina B, que en la hipófisis disminuye la secreción de FSH. A partir de la mitad de la fase de diestro II del ciclo estral, las células de la granulosa de los folículos preantrales incrementan su índice mitótico, por lo que aumenta el número de receptores a FSH (Gonzales, 2010).

Los folículos se hacen más sensibles a la FSH, formándose una cavidad o antro llena de líquido, rasgo característico del folículo terciario o antral. Las células que dan hacia el antro reciben el nombre de antrales, mientras que las que rodean al ovocito se denominan células del *cumulus oophorus* que mantienen una estrecha relación con el ovocito mediante uniones de tipo comunicantes o GAP y son las que acompañan al ovocito después de la ovulación, formando la corona radiada (Botella, 1995; Gonzales, 2010).

Los folículos preovulatorios, también denominados folículos preovulatorios o de "Graaf", se transforman en atrésicos o son seleccionados para continuar el desarrollo hacia folículos ovulatorios. En roedores, la selección folicular ocurre durante la fase de proestro previa al ciclo estral en el cual estos folículos ovularán. En esta etapa el incremento en la secreción de estrógenos por los folículos preovulatorios ejerce una retroalimentación negativa en el hipotálamo e hipófisis, inhibiendo la liberación de GnRH y de gonadotrofinas, respectivamente (Gonzales, 2010).

En la rata, la LH aumenta la formación de prostaglandinas (PGs) en la granulosa y en la coneja se determinó que las PGs como la PGE-2 actúan para la disgregación de la corona radiada, estimulación en enzimas proteolíticas, y la estimulación de la contracción ovárica. Horas antes de la rotura, en las células de la granulosa se produce progesterona y estrógenos, lo que reblandece la pared folicular y favorece la rotura (Botella, 1995).

La ovulación es un proceso que se da por un brusco aumento de LH el cual se denomina pico preovulatorio y ocurre en la fase de proestro, que provoca la última parte de la fase folicular e involucra diferentes tipos celulares y cambios en los patrones de expresión génica dentro de las células, lo que lleva a un proceso similar a una inflamación aguda localizada (Espey, 1994; Richards *et al.*, 2008; Baravalle *et al.*, 2013). Horas antes de la rotura, en las células de la granulosa se produce progesterona y estradiol, lo que reblandece la pared folicular y favorece la rotura. En la rata, la LH aumenta la secreción de prostaglandinas en la granulosa que activan a enzimas proteolíticas que degradan a la corona radiata y estimulan la contracción de las células del tejido muscular liso que rodea a las células de la teca externa que conlleva a la liberación del ovocito (Botella, 1995).

Después de la ovulación se forman los cuerpos lúteos, constituidos por células de la teca y granulosa del folículo ovárico, que después de la liberación del ovocito se luteinizan y se transforman en células luteales que producen progesterona. Los cuerpos lúteos son estructuras endocrinas transitorias que involucionan hasta perder su capacidad de sintetizar hormonas (Geneser, 2000).

Existen diferentes criterios para denominar las etapas del desarrollo folicular entre ellas está la clasificación del reclutamiento folicular sugerida por McGee y Hsueh (2000), en la que diferencia el reclutamiento inicial del reclutamiento cíclico. Durante el reclutamiento inicial, la liberación de factores intraováricos y liberación de mensajeros químicos estimulan a algunos folículos primordiales a iniciar su crecimiento, mientras que el resto permanece en estado latente. Aún no se conocen los mecanismos específicos que regula el inicio del reclutamiento de los folículos de reserva.

El reclutamiento inicial se propone como un proceso continuo que comienza justo después de la formación de los folículos, esto es que los folículos en reposo están bajo la continua influencia de factores inhibitorios, ya sea de origen local o sistémico, que hacen que permanezcan en latencia (Wandji *et al.*, 1996; Pagés y Aller, 2006). La disminución de los factores inhibitorios o el aumento de los factores estimulantes como LH y FSH, aceleran el reclutamiento, sin embargo los folículos primordiales carecen de receptores para LH y FSH, así que actúan de forma indirecta (Oktay *et al.*, 1997; Pagés y Aller, 2006).

En contraste, el reclutamiento cíclico comienza después de la pubertad y es resultado del incremento de los niveles circulantes de FSH; actúa como factor de supervivencia y el papel de LH en la supervivencia de los folículos podría ser mediada por estrógenos. Estos procesos se llevan a cabo en cada ciclo reproductivo (McGee y Hsueh, 2000; Pagés y Aller, 2006).

#### **D. Esteroidogénesis**

En los tejidos esteroidogénicos; ovario, testículo y glándula adrenal, la ruta de síntesis de hormonas esteroides es similar (Arechavaleta-Velasco *et al.*, 2009). En el ovario las células de la granulosa, teca y del cuerpo lúteo son productores de hormonas esteroides (Botella, 1995). A lo largo de la maduración folicular se sintetiza la progesterona, testosterona y estradiol en respuesta al estímulo de LH y FSH. El precursor común de estas hormonas es el colesterol, el cual es transformado a distintos metabolitos mediante una serie de pasos enzimáticos (Botella, 1995; Gonzales, 2010).

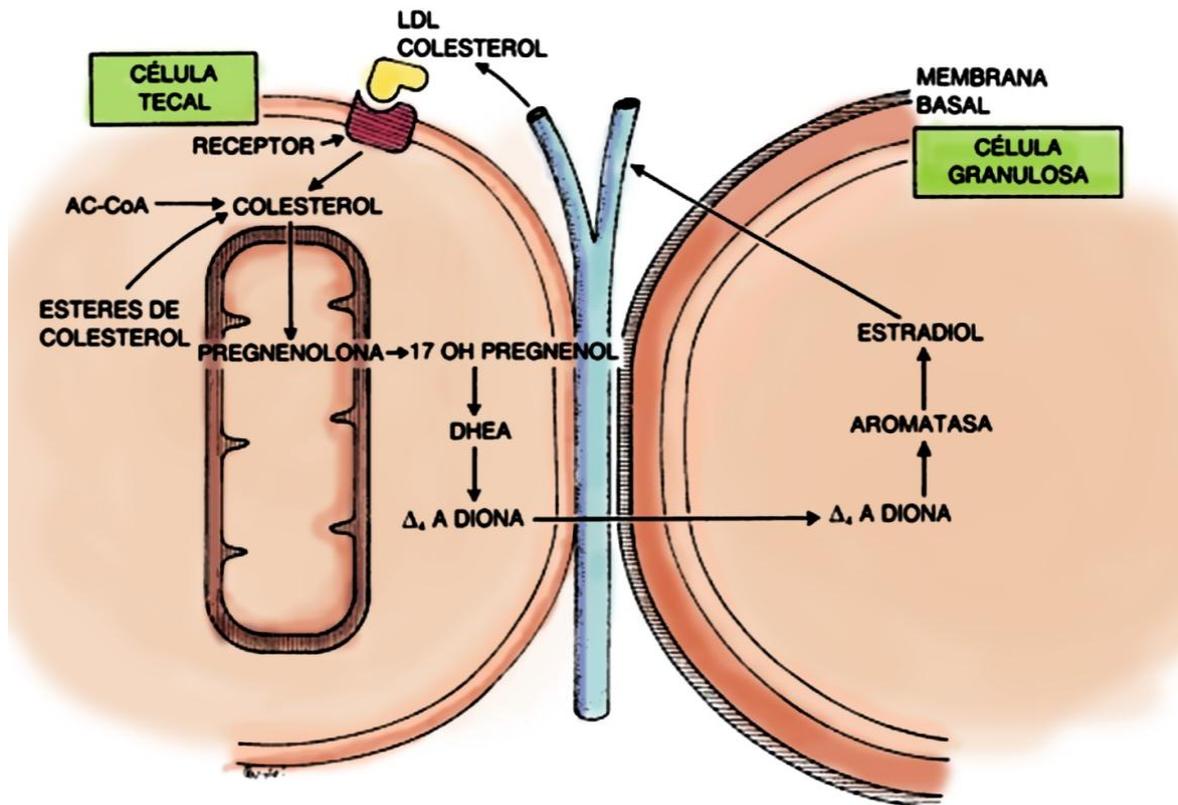
El colesterol proviene de tres fuentes: 1) de lipoproteínas de baja densidad (LDL) que se encuentran en la circulación, 2) a partir de síntesis de *novo* y 3) de almacenamientos intracelulares en forma de ésteres de colesterol. El colesterol-LDL es transportado al interior de la célula de la teca por endocitosis mediado por receptores asociados a la membrana plasmática. En el interior de la célula, el colesterol atraviesa el espacio que se encuentra entre la membrana externa y la membrana interna de la mitocondria y de esta forma se pone en contacto con la proteína CYP11A (citocromo del clivaje de la cadena lateral del colesterol) o P450<sub>scc</sub> (cuyas siglas en inglés significan side chain cleavage). Este proceso es modulado por la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (*StAR*, cuyas siglas en inglés significan Steroidogenic Acute Regulatory protein) (Stocco, 2000; Gonzales, 2010; Gomez-Chang *et al.*, 2012).

El primer paso de la síntesis de esteroides es la conversión de colesterol de 27 átomos de carbono a pregnenolona que es de 21 átomos de carbono, el cual se lleva a cabo por un único complejo enzimático denominado P450<sub>scc</sub> o CYP11A y es considerado un paso limitante en la velocidad de síntesis de esteroides dependiendo de la biodisponibilidad del colesterol (Nelson *et al.*, 1996; Gomez-Chang *et al.*, 2012).

La progesterona, es el intermediario común en la biosíntesis de las hormonas esteroideas producidas por el ovario. Una vez sintetizada, abandona la mitocondria y en el retículo endoplasmático liso es convertido en progesterona por acción de la enzima  $3\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta 4$ -5 isomerasa ( $3\beta$ -HSD). Esta hormona es el primer compuesto con actividad biológica que es secretado por células de la teca y en menor medida por las células de la granulosa. La fuente principal en el ovario de progesterona durante la fase lútea del ciclo ovárico y en primera parte de la preñez son las células del cuerpo lúteo (Gonzales, 2010; Gomez-Chang *et al.*, 2012).

El complejo enzimático, componente también de las membranas del retículo endoplasmático liso, que interviene en el siguiente paso, es el compuesto por la enzima  $17\alpha$  hidroxilasa /C-17,20 liasa (CYP17). Este es otro punto de regulación de la síntesis folicular de esteroides. Ambas reacciones que posee esta enzima, ocurren en forma concertada sin aparición del  $17\alpha$  hidroxilasa intermediario en forma libre. Tanto la pregnenolona como la progesterona pueden ser utilizados como sustrato de este complejo enzimático para dar dehidroepiandrosterona (DHEA) y androstenediona, respectivamente. Dado que las células teca-intersticiales poseen alta actividad de estas enzimas, se les considera la principal fuente celular de andrógenos foliculares. La vía de síntesis de andrógenos dada por la pregnenolona, se denomina vía  $\Delta 5$ , siendo la vía  $\Delta 4$  la que se desarrolla utilizando a la progesterona como sustrato (Botella, 1995; Yen *et al.*, 2001; Gonzales, 2010; Gomez-Chang *et al.*, 2012).

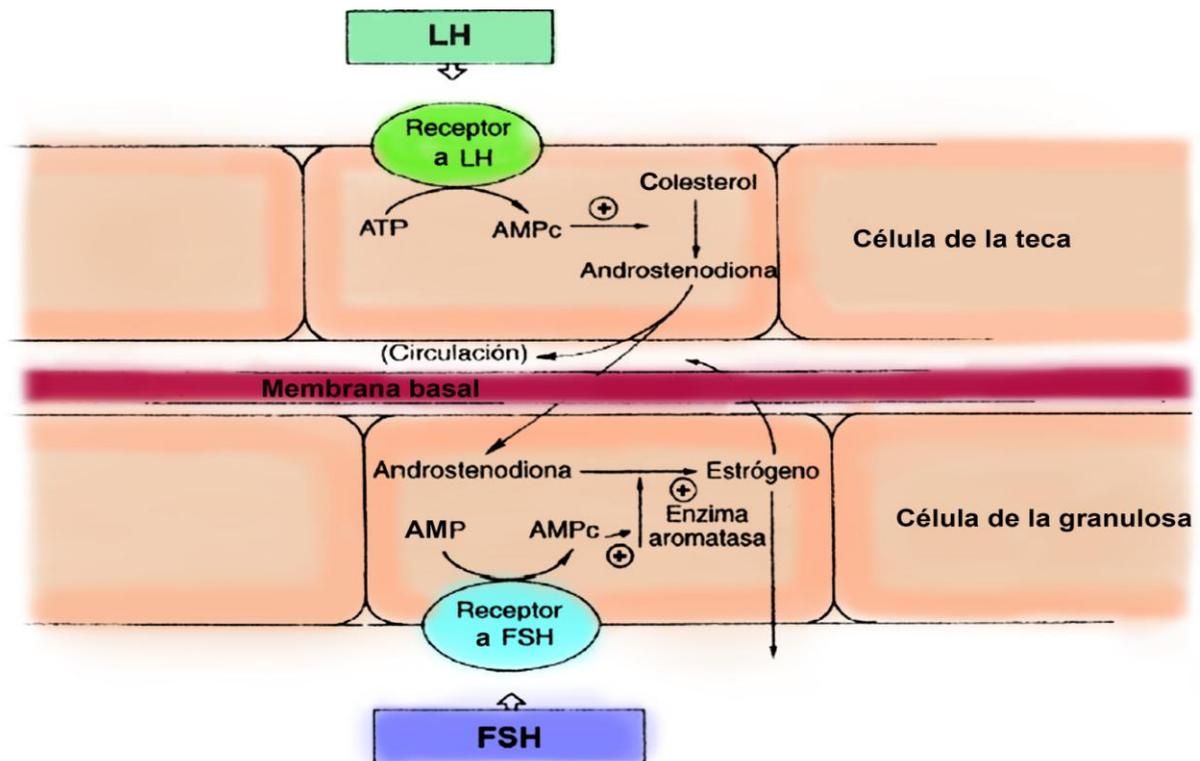
La androstenediona y testosterona son precursores inmediatos en la síntesis de esteroides estrogénicos, estrona y  $17\beta$ -estradiol respectivamente, ya que son aromatizados, siendo el  $17\beta$ -estradiol aproximadamente 10 veces más potente que la estrona. Dicho proceso se realiza por el complejo enzimático situado en la membrana del retículo endoplasmático liso, al cual se lo denomina aromatasa (CYP19) debido a que sintetiza compuestos aromáticos. Las células de la granulosa constituyen la mayor fuente de estrógenos. Aunque estas células son capaces de producir progesterona en forma independiente, la síntesis de estrógenos requiere la cooperación entre las células de la granulosa y las células tecales vecinas. La participación de estos dos tipos celulares y de ambas gonadotropinas sostiene la hipótesis de dos células/dos gonadotropinas (Figura 5) (Yen *et al.*, 2001; Irustra, 2008; Gonzales, 2010).



**Figura 4. Síntesis de esteroides. DHEA (dehidroepiandrosterona); AC-CoA (acetil coenzima A) (Tomado de Botella, 1995).**

De acuerdo con la teoría de “dos células, dos gonadotropinas” (Fortune y Armstrong, 1977), la producción de estrógenos ováricos depende de la acción coordinada de las células de la teca y de la granulosa vía la acción de la LH y FSH respectivamente (Figura 5). Las células de la teca poseen receptores a LH y no están presentes en las células de la granulosa y su aparición es estimulada por la FSH (Pagés y Aller, 2006; Gonzales, 2010).

La LH al unirse a sus receptores de membrana en la célula de la teca, estimula la síntesis de progesterona y testosterona a partir de colesterol induciendo la expresión de enzima CYP11A y CYP17; la testosterona es el precursor que difunde hacia las células de la granulosa, en donde son aromatizados a estrógenos; la capacidad de transformar andrógenos en estrógenos es estimulada por la FSH. A su vez el E2 promueve la aparición de nuevos receptores de FSH en las células de la granulosa, lo que aumenta la sensibilidad del folículo a esta hormona e induce el crecimiento folicular (Carr *et al.*, 2005; Pagés y Aller, 2006).



**Figura 5. Modelo que representa la teoría de la doble célula, dos gonadotropinas en el ovario. ATP, (adenosín triposfato), AMPc (adenosín monofosfato cíclico), LH (hormona luteinizante), FSH (hormona estimulante del folículo), + (estimulante). (Tomado y modificado de Gonzales, 2010.)**

### E. Regulación del inicio de la pubertad

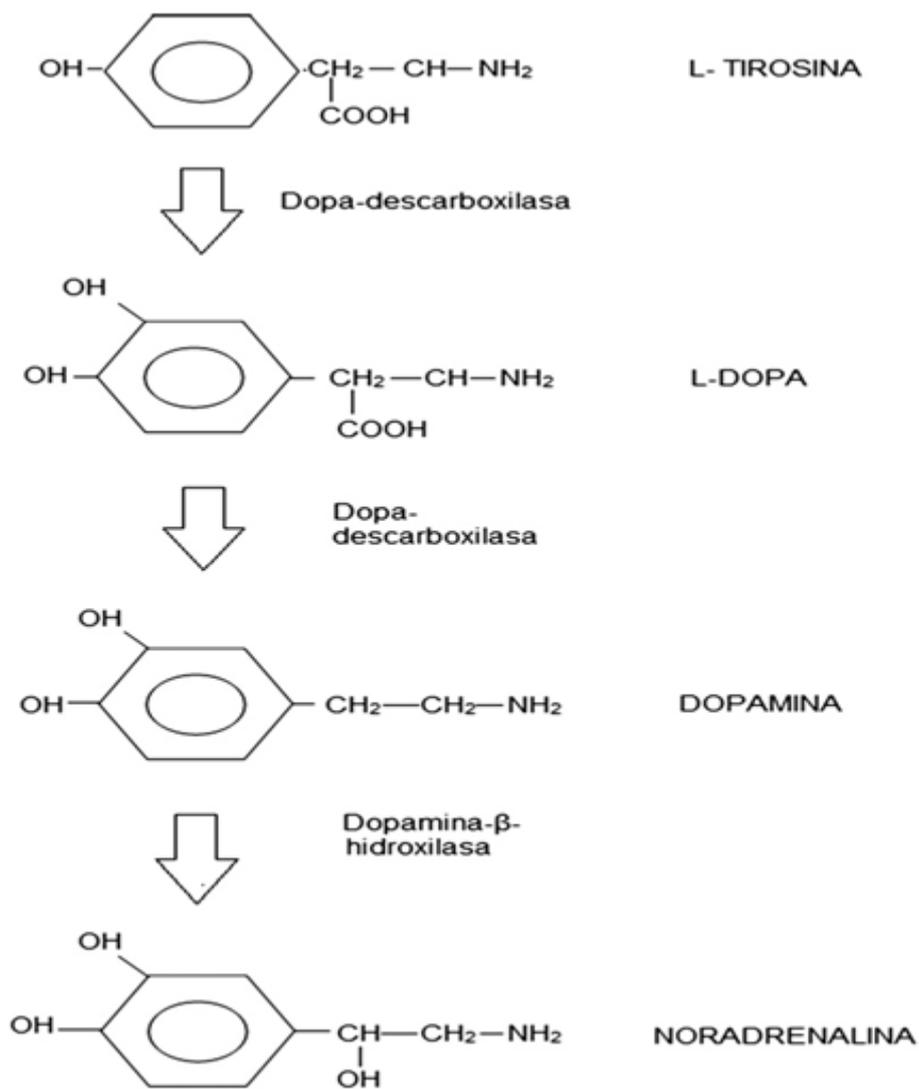
El inicio de la pubertad implica cambios de un tipo de secreción prepuberal de gonadotropinas, caracterizado por una baja actividad en las neuronas GnRH, que posteriormente incrementa la amplitud y frecuencia en los pulsos de GnRH. Durante el inicio de la pubertad, diversos sistemas de neurotransmisores como dopamina, noradrenalina, el ácido amonobutírico (GABA) se ven involucrados en la estimulación o inhibición de la secreción de GnRH. estos factores externos puede ser: el tono opiode endógeno, así la B-endorfina inhibe la liberación de GnRH del hipotálamo mediobasal en humano, el GABA también produce inhibición de GnRH en tanto, esta hormona es estimulada por dopamina (DA), noradrenalina (NA) y serotonina (5HT) (Ojeda *et al.*, 2006).

## F. Sistema noradrenérgico

Los somas de la neuronas que sintetizan noradrenalina (NA) se localizadas en tres áreas del encéfalo; el núcleo *Locus Coeruleus* (LC), el sistema tegmental lateral del mesencéfalo y el grupo bulbar dorsal (Bronwn, 1994; Kuhar *et al.*, 1999, Rosenzweig *et al.*, 2005). Las células noradrenérgica están organizadas en paquetes celulares denominados como A1, A2, A3, A4, A5, A6, A7 (Dahlström y Fuxe 1965). Las neuronas del grupo A1 se localizan en el núcleo ventrolateral caudal, A2 en el núcleo caudal del tracto solitario, el grupo A5 en la porción ventral del puente, los paquetes celulares A3, A4 y A7 en la formación reticulada mesencefálica y las células del grupo A6 se localizan en el LC (Kuhar *et al.*, 1999; Weiner y Molinoff, 1999).

El LC es considerado como el principal núcleo noradrenérgico en SNC (Lechin *et al.*, 2005, Aston-Jones y Cohen, 2005). En la rata se localiza en la base del cuarto ventrículo y en la región dorsolateral del núcleo *pontino* (Conn, 2008). Sus células son de tamaño mediano con núcleos excéntricos que contiene gránulos de melanina y células ovals de pequeño citoplasma y sin pigmento (Aston-Jones y Cohen, 2005; Szot *et al.*, 2006). En la rata el número de neuronas es alrededor de 1,500 en cada lado del cerebro (Carpenter, 1994).

La NA es un neurotransmisores que en su estructura química poseen un grupo aromático 3,4-dihidroxifenilo o catecol. La síntesis de la catecolamina requiere la actividad de la enzima tirosina hidroxilasa (TH), que convierte a la tirosina en dihidroxifenilalanina (L-dopa); la L-aminoácido-aromático-descarboxilasa (LAAD), transforma la L-dopa en dopamina; la dopamina-β-hidroxilasa (DBH), hidroliza a dopamina en noradrenalina (Figura 6) (Flórez, 1997).



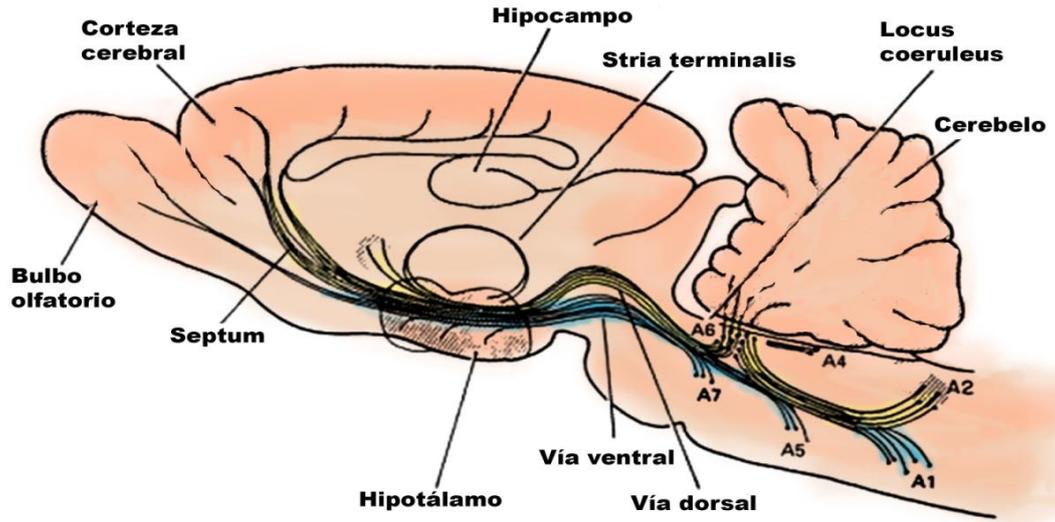
**Figura 6. Esquema que representa la síntesis de noradrenalina (Tomado y modificado de Flórez, 1997).**

La noradrenalina liberada activa los receptores adrenérgicos, localizados en la membrana de la célula postsináptica o en la membrana de las varicosidades presinápticas. Los receptores son glucoproteínas de membrana de 64-68 kD, cuyas cadenas polipeptídicas (402-525 aminoácidos) poseen secuencias fuera de la célula (extremo terminal-NH<sub>2</sub>), en la membrana celular (siete hélices transmembrana) y en el citoplasma (extremo terminal-COOH). Los encargados de activar la transducción de señales vía las proteínas G. Se han identificado dos familias de receptores a noradrenalina: los  $\alpha$  y  $\beta$ -adrenérgicos que a su vez poseen subtipos, tres tipos de  $\beta$  ( $\beta_1$ ,  $\beta_2$  y  $\beta_3$ ), cuatro de  $\alpha$ -1 ( $\alpha$ -1A,  $\alpha$ -1B,  $\alpha$ -1C, y  $\alpha$ -1D) y tres de  $\alpha$ -2 ( $\alpha$ -2A,  $\alpha$ -2B y  $\alpha$ -2C) (Flórez, 1997; Heinz, *et al.*, 2010). Los receptores adrenérgicos están asociados a la proteína G, que activan diferentes vías de señalización y segundos mensajeros (Flórez, 1997).

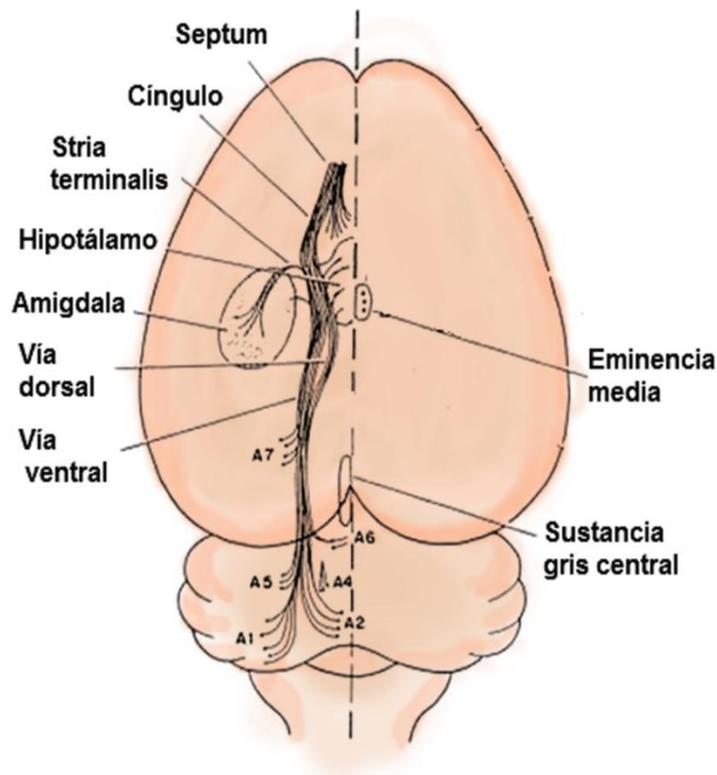
La activación de los receptores  $\beta$ , incrementa el adenosin monofostato cíclico (AMPc) y desencadenan la fosforilación de las proteínas celulares, los receptores  $\alpha$ -1 activan a la fosfolipasa C y producen inositol trifosfato (IP<sub>3</sub>) y diacilglicerol (DAG), este último inicia la cascada de fosforilación de proteínas, el IP<sub>3</sub> abre los canales de calcio y de esta manera crea señales de calcio intracelular, mientras que los receptores  $\alpha$ -2 disminuyen al AMPc (Flórez, 1997).

Las fibras noradrenérgicas que inervan diferentes estructuras del sistema nervioso central (SNC) se dividen en dos vías, la dorsal y la ventral. La región A6 localizada en *Locus Coeruleus* conforma la vía dorsal que inervan la espina dorsal, corteza, el cerebelo, hipocampo e hipotálamo. La vía ventral, corresponde a la región A1, A2, A5 y A7, se localiza en el área tegmental ventral e inervan el órgano vasculoso de la lámina terminal e hipotálamo (Kuhar *et al.*, 1999). En el hipotálamo la NA se localiza en la parte central y rostral de la eminencia media (EM), se extiende a la región del surco tubero-infundibular y rodea el área dorsomedial de la *pars tuberalis* de la hipófisis y el área preóptica medial (Day *et al.*, 1980; Wright y Jennes, 1993). En la banda diagonal de broca, alrededor de la lámina terminal del órgano vasculoso, la porción lateral del tercer ventrículo y en la capa subependimal de la EM existe una sobreposición de fibras noradrenérgicas y GNRHérgicas (Jennes *et al.*, 1982) (Figura 7 A y B). Además se ha descrito que en la neurona GnRH se expresan receptores a NA del tipo  $\alpha$ -1<sub>b</sub> (Neill *et al.*, 2006) y  $\alpha$ -2<sub>A</sub> (Lee *et al.*, 1995). La influencia estimuladora de la NA en la actividad de la neurona secretora de GnRH es vía los receptores  $\alpha$ -1 adrenérgicos (Hosny y Jennes, 1998; Smith y Jennes, 2001).

A)



B)



**Figura 7. Representación esquemática de las vías noradrenérgicas ascendentes en el cerebro de la rata. Las zonas sombreadas indican las principales regiones de terminación nerviosa. (Nomenclatura de los grupos celulares según Dahlström y Fuxe 1965). A) Vista sagital, B) Vista horizontal (Adaptado de Yong y Cohen, 1979; Tomado de Mardomingo, 1994).**

## **G. Participación del sistema noradrenérgico en la regulación de la secreción de las gonadotropinas y la ovulación**

La participación de las catecolaminas en la regulación de la secreción de GnRH y de las gonadotropinas ha sido ampliamente estudiada en el animal adulto. Se considera que la NA es un neurotransmisor que estimula la secreción de GnRH, LH, el desarrollo folicular, la esteroidogénesis ovárica y la ovulación (Sawyer *et al.*, 1947; Lara *et al.*, 1990; Herbison, 1997; Yen *et al.*, 2001; Itoh e Ishizuka, 2005; Ebeid *et al.*, 2008; Szawka *et al.*, 2009).

En la rata adulta la concentración de NA en la eminencia media se incrementa en la tarde del proestro, previo al “pico” preovulatorio de la secreción de LH (Rance *et al.*, 1981) y en los otros días del ciclo no se observan cambios (Kerdelhué *et al.*, 1989). La actividad de la dopamina- $\beta$ -hidroxilasa (enzima limitante en la síntesis de NA) se incrementa en el hipotálamo medio basal en proestro (Carr y Voogt, 1980) así como la tasa de recambio de las catecolaminas en el área preóptica (POA) en la tarde del proestro, evento que coincide con el incremento en la concentración plasmáticas de LH (Advis *et al.*, 1978, Honma y Wuttke, 1980). Por lo anterior se sugiere que NA estimula los mecanismos neuroendocrinos que modulan la secreción de LH y la ovulación (Rance *et al.*, 1981).

En la rata en proestro, la administración de reserpina (inhibidor del sistema catecolaminérgico) bloquea la ovulación y disminuyó la concentración de dopamina, noradrenalina y serotonina en el hipotálamo. Sin embargo, la administración previa de inhibidores de la monoamina oxidasa (enzima que degrada las catecolaminas) no modificó la ovulación y la concentración de los neurotransmisores. Estos resultados son interpretados como el efecto estimulante que ejercen las catecolaminas en la regulación de la secreción de las gonadotropinas (Meyerson y Sawyer, 1968).

En hembras castradas la inhibición de la síntesis de NA, el bloqueo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgico o la administración de 6-hidroxidopamina en el bulbo ventral noradrenérgico inhibe la liberación pulsátil de LH. Sin embargo, el bloqueo de los receptores  $\beta$ -adrenérgicos inducido por la administración de propanolol no la modifica (Weick, 1978). Asimismo, en el mono hembra castrada el bloqueo de los receptores  $\alpha$ -adrenérgico con fenoxibenzamina inhibe la liberación de LH, en cambio la administración de propanolol no la modifica (Bhattachaya *et al.*, 1972). En conjunto estos resultados

permiten sugerir que en el animal adulto, el sistema noradrenérgico regula de manera estimulante la liberación de LH vía los receptores  $\alpha$ -adrenérgicos.

La inhibición de la síntesis de catecolaminas inducida por la  $\alpha$ -metil-p-tirosina a ratas de 14 o 26 días de edad, resulta en el incremento de la secreción de LH. Mientras que la hembra de 30 días o en el adulto castrado disminuye la secreción de LH. Estos resultados los autores concluyen que el sistema noradrenérgico participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la función del eje hipotálamo hipofisiario de manera diferencial durante el desarrollo del animal, inhibitoria en la etapa prepuberal tardía y estimulante en la adulta (Moguilevsky *et al.*, 1990; Moguilevsky y Wuttke, 2001).

En ratas hembras castrada el implante de estradiol aumenta la frecuencia de disparo de las neuronas noradrenérgicas que inervan el área preóptica e hipotalámica anterior (Kaba *et al.*, 1983), aumenta la actividad de los receptores  $\alpha_1$  en neuronas del área preóptica y disminuye la expresión del ARN<sub>m</sub> que codifica para el receptor  $\alpha_2$  (Wagner *et al.*, 2001). Con base en estos resultados los autores proponen que los estrógenos modulan la actividad de la neurona noradrenérgica.

En los mamíferos se sugiere que la NA que llega al ovario vía la inervación simpática o la sintetizada de *novo* participa en la regulación de las funciones ováricas (Itoh e Ishizuka, 2005; Ebeid *et al.*, 2008). En el animal adulto la NA modula la esteroidogénesis ovárica y promueve el desarrollo folicular ovárico (Lara *et al.*, 1990; Shu-Ping y Voogt, 2000; Paredes *et al.*, 2011).

En otras especies como en la gallina doméstica la administración de NA al final de su vida reproductiva incrementa el desarrollo folicular, la concentración de estradiol y la ovulación. Estos resultados sugieren que la NA es esencial en el desarrollo de la ovulación (Ebeid *et al.*, 2008).

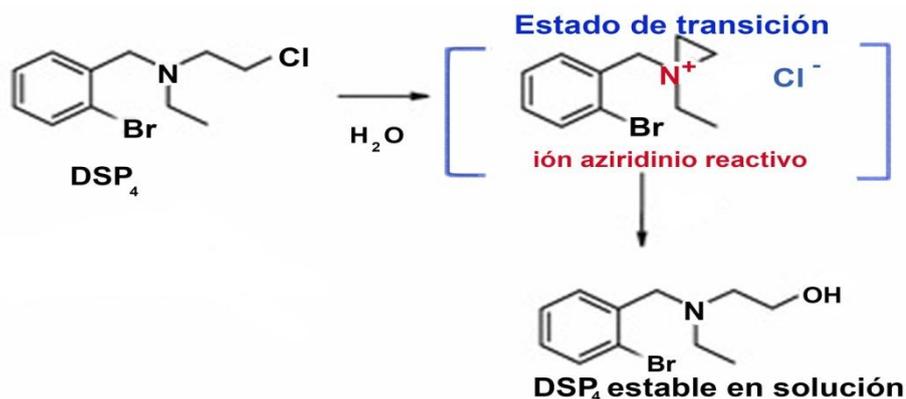
En el SNC y periférico se han utilizado diferentes herramientas farmacológicas en la manipulación del sistema noradrenérgico, como el N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP<sub>4</sub>), neurotóxico selectivo de las neuronas noradrenérgicas (Birger y Bönisch, 2009, Dudley *et al.*, 1990, Fritschy y Grzanna, 1989; Ross y Renyl, 1976; Ross *et al.*, 1973; Ross y Stenfors, 2015).

El DSP<sub>4</sub> es un fármaco sintético que atraviesa la barrera hematoencefálica, es introducido a la terminal nerviosa noradrenérgica mediante el transportador de NA (*NAT*, por sus siglas en inglés) vía la activación del autorreceptor y una vez que ingresa inactiva al *NAT*. En el interior de la neurona el DSP<sub>4</sub> presenta una reacción rápida con el oxígeno, en la que se forma un compuesto cíclico, el ión aziridinio reactivo (DSP<sub>4az</sub>) (Figura 8A). Dentro de las terminales nerviosas, el derivado aziridinio inhibe la fosforilación oxidativa mitocondrial lo que provoca efectos sobre NADPH, succinato deshidrogenasa y la formación de ATP e induce la apoptosis de la neurona (Figura 8B), por lo que DSP<sub>4</sub> es considerado un inhibidor irreversible de este transportador (Ross y Stenfors, 2015).

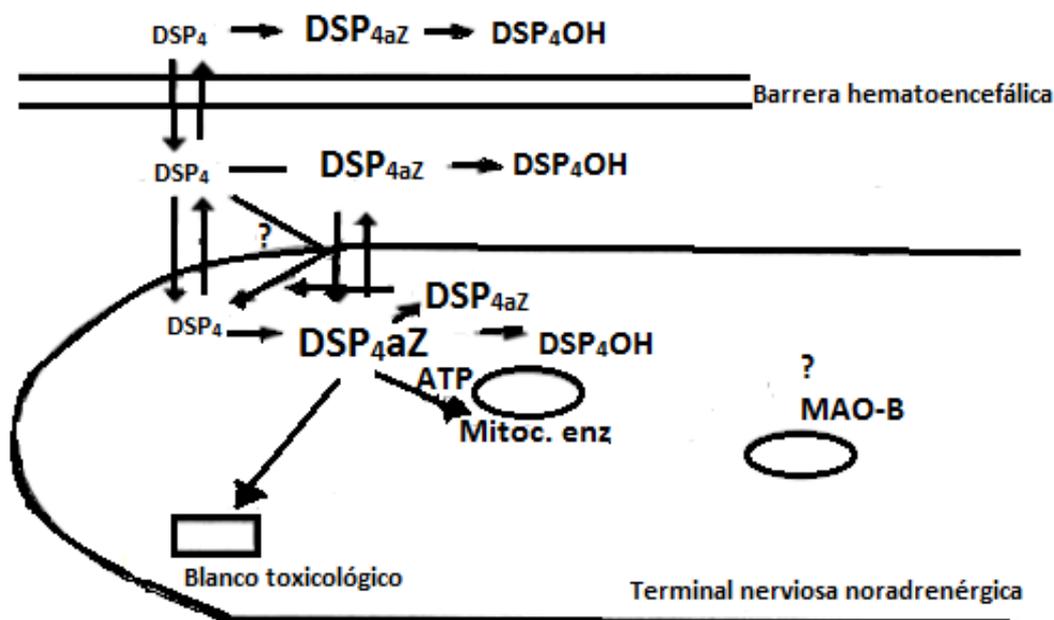
En ratas adultas la administración de DSP<sub>4</sub> por vía sistémica resulta en una menor concentración de NA en regiones cerebrales como la corteza, el hipocampo, cerebelo, bulbo olfatorio, tálamo, hipotálamo y la médula espinal (Hughes y Stanford, 1988; Fritschy y Grzanna, 1989; Dudley *et al.*, 1990; Birger y Bönisch, 2009). A dosis de 50 mg/kg i.p. de DSP<sub>4</sub> disminuye a largo plazo la secreción de NA y de la actividad de la enzima dopamina-β-hidroxilasa y la inmunorreactividad en las regiones inervadas por *Locus Coeruleus* (Ross y Stenfors, 2015).

Previamente se ha mostrado que en la rata en proestro, la inyección intrabursal de DSP<sub>4</sub> resulta en el bloqueo de la ovulación, acompañada de una menor concentración de NA en el ovario; mientras que la administración previa de un inhibidor de la recaptura de NA (desipramina) disminuye la ovulación (Goldman *et al.*, 1996). Además de que en dicha demostración también se ha sugerido que el efecto de antiovulatorio de DSP<sub>4</sub> es independiente de la concentración de NA en la gónada y dicha respuesta es resultado de la integridad funcional del proceso de ovulación.

A)



B)



**Figura 8. A) Reacción de ciclación de DSP<sub>4</sub> en ión aziridinio reactivo y forma estable hidrolizada. B) Propuesta del mecanismo de acción de DSP<sub>4</sub> en terminales nerviosas noradrenérgicas del núcleo Locus Coeruleus. DSP<sub>4</sub>, N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobencilamina); DMI, desipramina; DSP<sub>4aZ</sub>, aziridinio derivado de DSP<sub>4</sub>; DSP<sub>4OH</sub>, producto hidrolizado de DSP<sub>4</sub>, Mitoch. Enz, Enzimas mitocondriales; NA, noradrenalina; NAT, transportador de noradrenalina; Blanco Tox, objetivo tóxico para DSP<sub>4</sub>; H<sub>2</sub>O, agua, (Tomado y modificado de Ross y Stenfors, 2015).**

Existe evidencia de que en la rata de 5 o 23 días de edad una sola inyección de 50 mg/kg de DSP<sub>4</sub> induce el retraso de la apertura vaginal y la disminución de la concentración de NA en el hipotálamo, sin modificar el número de cuerpos lúteos en los ovarios de los animales. Mientras que en la hembra de 24 días de edad tratada con la gonadotropina de suero de yegua preñada, más DSP<sub>4</sub>, resulta en un menor número de cuerpos lúteos y de la concentración de NA (Jacobson *et al.*, 1988). Con base en la previa información se propone que el sistema noradrenérgico es esencial en la liberación de LH y en el inicio de la pubertad.

Resultados recientes del laboratorio han mostrado que en el animal de 30 días de edad la denervación noradrenérgica inducida por la una sola inyección de DSP<sub>4</sub> retrasa la edad de la apertura y la presencia del primer estro vaginal y disminuye la ovulación y la concentración de progesterona y estradiol, acompañada de una menor concentración de NA en el hipotálamo medio (Rayón, 2014), mientras que cuando se realiza la denervación a los 25 días de edad no cambia la concentración de progesterona y estrógenos (Salazar, 2013). Estos resultados los llevaron a pensar que en el animal juvenil el sistema noradrenérgico participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la ovulación.

Sin embargo, hasta el momento no es claro la partición del sistema noradrenérgico a lo largo del desarrollo prepuberal del animal en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad y ovulación.

### **III. Justificación**

Las evidencias experimentales antes citadas muestran que en el sistema nervioso central del animal adulto, la noradrenalina actúa como un neurotransmisor que regula de manera estimulante la secreción preovulatoria de GnRH y LH. No se conoce con certeza la participación de este sistema de neurotransmisión a lo largo del desarrollo posnatal, por lo que no se puede descartar que sea uno de los factores que modulen el inicio de la pubertad y las funciones del ovario.

Dado lo anterior, en el presente estudio se analizó la participación del sistema noradrenérgico sobre la edad de la apertura vaginal, el primer estro, la ovulación, la concentración sérica de hormonas esteroides ováricas (progesterona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol) y la concentración de NA, en el hipotálamo, hipófisis y ovarios de ratas hembras prepúberes con inhibición del sistema noradrenérgico inducido por la administración del neurotóxico DSP<sub>4</sub> a diferentes edades del desarrollo posnatal.

#### **IV. Hipótesis**

En el animal adulto el sistema noradrenérgico participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan la secreción preovulatoria de la GnRH y LH y por ende la ovulación, por lo que la inhibición del sistema noradrenérgico realizada a diferentes edades del desarrollo prepuberal del animal, modificará el inicio de la pubertad y las funciones del ovario que dependerán de la edad en que se realice la modificación de dicho sistema de neurotransmisión.

## V. Objetivo General

Analizar a lo largo del desarrollo prepuberal la participación del sistema noradrenérgico sobre los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad y las funciones de la gónada en la rata hembra.

## VI. Objetivos particulares

- ✓ Analizar en la rata prepúber los efectos de la administración de **N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida** sobre la concentración de noradrenalina y del ácido 3-metoxi-4-hidroxifeniletilenglicol (MHPG) en el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios.
- ✓ Analizar en la rata prepúber los efectos de la administración de **N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida** sobre la edad de la apertura y del primer estro vaginal.
- ✓ Analizar en la rata prepúber los efectos de la administración de **N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida** sobre la primera ovulación.
- ✓ Estudiar en la rata prepúber los efectos de la administración de **N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida** sobre la concentración sérica de progesterona, testosterona y 17 $\beta$ -estradiol.

## **VII. Materiales y Métodos**

Se utilizaron ratas hembras de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de iluminación: con 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h), con libre acceso a la madre hasta el destete (21 días) y posteriormente con agua y alimento hasta el momento del sacrificio. Los animales fueron distribuidos al azar de acuerdo los siguientes grupos experimentales.

**Grupo con inyección del fármaco:** animales recién nacidos (RN), de 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad se les administró por vía i.p. una dosis única de 50 mg/kg de PC de DSP<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich,EUA). La dosis y frecuencia de administración de fármaco se seleccionó con base en lo reportado Ross y Renyl (1976), Fritschy y Granna, (1991) y Jaim-Etcheverry, (1998), dosis que disminuye la síntesis y catabolismo de la NA hasta por tres meses.

**Grupo con inyección del vehículo (Vh):** animales de las edades antes mencionadas se les administró por vía i.p solución fisiológica (cloruro de sodio al 0.9%) (Vehículo en el que se disuelve el fármaco).

**Testigo absoluto (TA):** animales sin ningún tratamiento.

A todos los animales se les registró el día en que se presentó la canalización de la vaginal, momento en el que se inició la toma diaria de frotis vaginales que se tiñeron con la técnica de hematoxilina-eosina.

Los animales de los diferentes grupos experimentales fueron pesados y sacrificados por decapitación entre las 07:00 y 09:00 horas en el día del primer estro vaginal (presencia de células cornificadas en el frotis vaginal).

### **A. Procedimiento de autopsia**

A la autopsia se colectó la sangre del tronco, se dejó coagular por 15 minutos y se centrifugó a 3500 rpm por 15 min., a temperatura ambiente. El suero se almacenó a -20°C hasta la cuantificación de hormonas esteroides.

Se extrajo el cerebro y la hipófisis que se enjuagaron en solución fisiológica fría (4°C). El cerebro se congeló con nitrógeno líquido y se disecó el hipotálamo anterior y medio en cortes coronales, para la separación del hipotálamo anterior (HA) se consideró como límite rostral el quiasma óptico y la comisura anterior, lateralmente por los surcos hipotalámicos laterales y caudalmente por el área retroquiasmática y el tracto mamilotalámico e hipotálamo medio (HM), el cual se delimitó rostralmente por el tracto mamilotalámico y por los cuerpos mamilares. La profundidad del corte para la disección de cada una de las regiones del hipotálamo fue de 3 mm aproximadamente, tomado como referencia el atlas de Paxinos y Watson (1998). Los ovarios se extrajeron, disecaron y almacenaron a -70°C hasta el momento su cuantificación de noradrenalina y su metabolito del ácido 3-metoxi-4-hidroxi fenil etilenglicol (MHPG) por cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC).

El útero se disecó y se pesó en balanza de precisión y las trompas uterinas se revisaron y con ayuda del microscopio estereoscópico se contó el número de ovocitos liberados cuando estaban presentes. Las muestras del hipotálamo, la hipófisis y los ovarios fueron almacenadas a -70°C hasta la cuantificación de NA y MHPG por HPLC.

## **B. Cuantificación de noradrenalina y su metabolito**

La muestra de tejido de hipotálamo anterior, medio, la hipófisis o de ovario se pesaron en balanza analítica, se colocaron por separado en microtubos de 1.5 mL con 300 µL de solución de ácido perclórico al 0.1 N (J.T. Baker, México) para el hipotálamo y los ovarios y 150 µL para hipófisis. Posteriormente los tejidos fue homogenizaron por sonicación en frío por 5 segundos y se centrifugaron a 12,000 rpm a -4°C por 30 minutos. El sobrenadante se filtró a través de una membrana de nitrocelulosa de tamaño de poro de 0.22 µm (Millipore Bedford, MA, USA) y se inyectaron 20 µL del extracto al sistema de HPLC.

El equipo de HPLC consistió de una bomba isocrática (modelo L-250, Perkin-Elmer Co., Norwalk, CT, USA), una válvula de inyección de seis puertos Rheodyne (modelo 7125, Perkin-Elmer Co., Norwalk, USA) con una capacidad de 20 µL y una columna de fase reversa C-18, 25 cm x 4.6 mm, con partícula de 10 µL de diámetro (Bionalytical Systems, USA) acoplada a un detector electroquímico (modelo L-4-C4, Bionalytical Systems, USA) conformado por un electrodo de trabajo de carbono vidriado y un electrodo

de referencia de plata/cloruro (Ag/AgCl), con un rango de 5 nA y voltaje de 850 mV con una sensibilidad entre 700-900. Los datos obtenidos fueron procesados por un integrador Nelson (modelo 1020, Perkin Elmer, USA).

La fase móvil consistió de un buffer de citrato al 0.1 M (pH 3) con 200 mg de ácido 1-octanosulfónico. La solución se filtró a través de una membrana de celulosa (poro de 0.22 µm) y de gaseada a vacío. Se agregaron 20 mL de acetonitrilo (Omnisolve, EM Science, Canadá) y 21.5 mL de tetrahidrofurano (Omnisolve, EM Science, Canadá), con un volumen final de 500 mL. La fase fue bombeada a una velocidad de 1.2 mL/min.

Se emplearon soluciones estándar de NA y MHPG (Sigma, USA), preparadas y diluidas en ácido perclórico al 0.1N y almacenadas a -70°C. El sistema fue calibrado con el método de estándar externo empleando el área de los picos obtenido en el cromatograma de tres concentraciones diferentes de estándares (0.1, 0.5 y 1 ng) como punto de calibración ajustados a una curva lineal partiendo del origen por el método de regresión de mínimos cuadrados aceptando como factor de correlación para cada compuesto que fuera igual o mayor a 0.98. Los compuestos fueron identificados por el tiempo de retención relativos. La concentración se calculó empleando el integrador al comparar el área bajo la curva de la muestra problema, con el área bajo la curva de la solución de referencia. La concentración se expresó en nanogramos por miligramo de tejido (ng/mg de tejido). Para el hipotálamo anterior y medio, se calculó la actividad de la neurona noradrenérgica (Kerdelhue *et al.*, 1989):

$$\text{Actividad de la neurona} = \frac{\text{[ Metabolito ]}}{\text{[ Neurotransmisor ]}}$$

### C. Cuantificación de hormonas esteroideas

La cuantificación de progesterona, testosterona y 17β-estradiol se realizó por radioinmunoanálisis de fase sólida, con un kit comercial (Coat-A-count, USA). Los valores de progesterona se expresaron en ng/mL y para testosterona y 17β-estradiol en pg/mL. Para la cuantificación se realizaron curvas patrón de la siguiente manera.

### **C.1. Progesterona**

La curva patrón se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores de 0.0, 0.1, 0.5, 2, 10, 20 y 40 ng/mL.

Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fue de 36.9% y 10.8% y el límite de detección fue de 0.003 ng/mL.

### **C.2. Testosterona**

La curva patrón se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores de 0.0, 0.1, 0.2, 0.5, 1, 2, 4, 8 y 16 pg/mL.

Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fue de 5.6% y 8.7% y el límite de detección fue de 0.0006 pg/mL.

### **C.3. Estradiol**

La curva patrón se realizó por duplicado, se utilizaron calibradores de 0.0, 20, 50, 150, 500, 1800 y 3600 pg/mL.

Los coeficientes de variación intra e inter ensayo fue de 5.6% y 8.7% y el límite de detección fue de 1.6 pg/mL.

## **D. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos sobre la edad de la apertura vaginal, del primer estro, el número de ovocitos liberados fueron analizados por una prueba de Kruskal-Wallis seguida de una prueba de Dunn. La tasa de animales ovulantes fue analizada por la prueba exacta de Fisher para proporciones. El peso del útero, la concentración de NA, MHPG, progesterona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol fueron analizados con una prueba de varianza múltiple seguida de una prueba de Tukey. En todos los casos se consideró como diferencias significativas aquellas con probabilidad igual o menor al 5%.

## **VIII. Resultados**

### **A. Efectos de la administración de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida sobre la concentración de noradrenalina y del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenil etilenglicol en el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios**

#### **A.1 Hipotálamo**

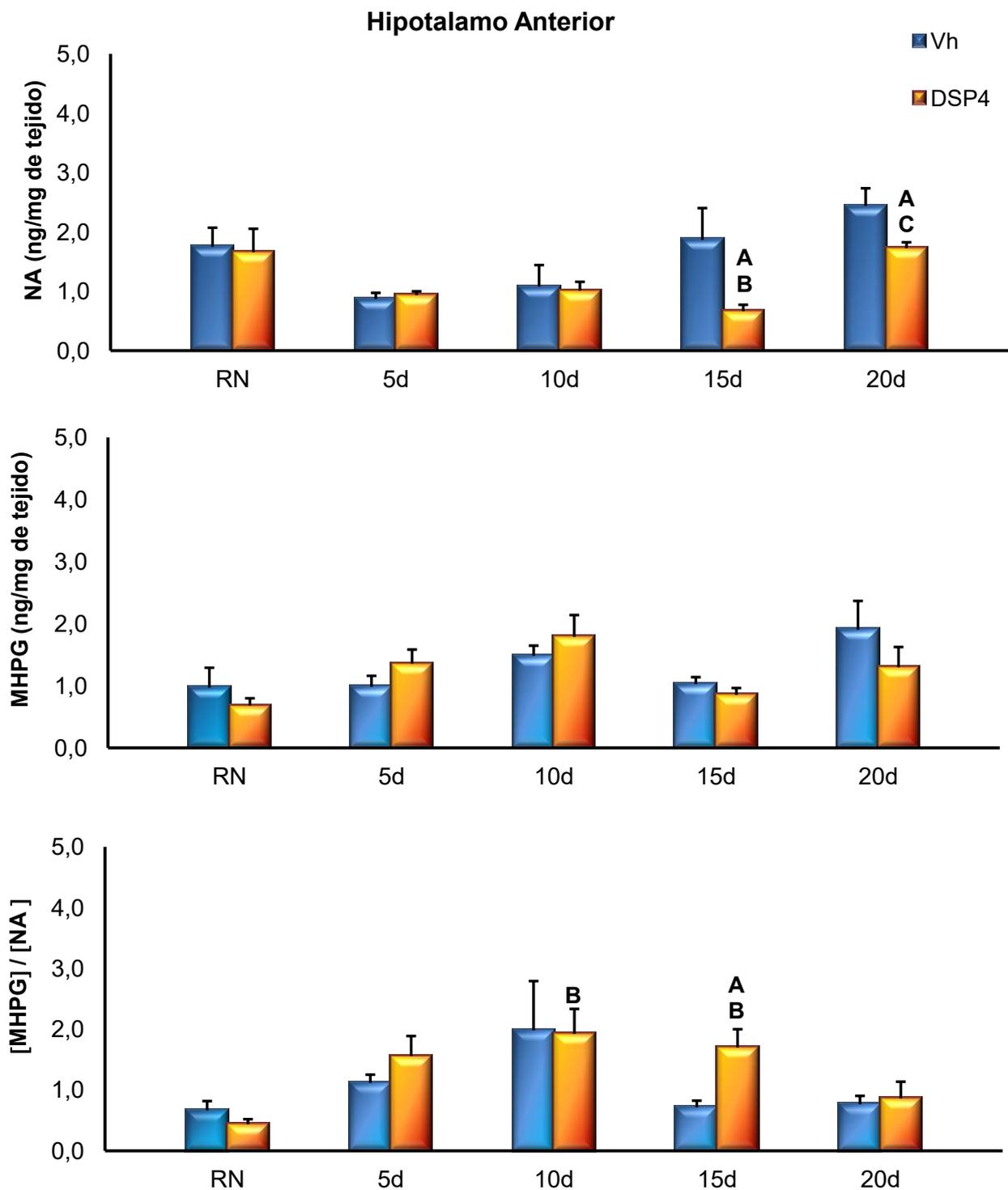
En comparación con el grupo de animales TA, la inyección de solución salina en los animales 5d resultó en una menor concentración de NA en el hipotálamo anterior y al día 20 se observó un comportamiento inverso. La concentración de MHPG fue mayor en el grupo de animales tratados a los 10, 15 o 20 días de edad. La relación [MHPG]/[NA] fue mayor en animales que se les inyectó vehículo. En el hipotálamo medio no se observaron cambios en ningún parámetro (Cuadro1).

**Cuadro 1. Media  $\pm$  e.e.m de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y la relación [MHPG]/[NA] en el hipotálamo anterior y medio de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con solución salina (Vh) al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

Grupo	NA	MHPG	[MHPG/NA]
<b>Hipotálamo Anterior</b>			
TA	1.6 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.0
Vh RN	1.8 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.3	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>
Vh 5d	0.9 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	1.0 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>
Vh 10d	1.1 $\pm$ 0.4	1.5 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	2.0 $\pm$ 0.8 <sup>A</sup>
Vh 15d	1.9 $\pm$ 0.5	1.0 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>	0.7 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>
Vh 20d	2.4 $\pm$ 0.3 <sup>A</sup>	1.9 $\pm$ 0.5 <sup>A</sup>	0.8 $\pm$ 0.1 <sup>A</sup>
<b>Hipotálamo Medio</b>			
TA	2.57 $\pm$ 0.81	1.88 $\pm$ 0.29	1.17 $\pm$ 0.52
Vh RN	3.42 $\pm$ 0.73	1.36 $\pm$ 0.18	0.48 $\pm$ 0.13
Vh 5d	1.69 $\pm$ 0.10	2.17 $\pm$ 0.17	1.31 $\pm$ 0.12
Vh 10d	0.96 $\pm$ 0.34	2.87 $\pm$ 0.49	4.05 $\pm$ 1.03
Vh 15d	1.78 $\pm$ 0.22	1.59 $\pm$ 0.15	0.92 $\pm$ 0.05
Vh 20d	2.45 $\pm$ 0.25	1.95 $\pm$ 2.93	0.90 $\pm$ 0.17

<sup>A</sup> p<0.05 vs grupo TA (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

En el hipotálamo anterior de los animales que se les inyectó DSP<sub>4</sub> a los 15 días o a los 20 días se observó una menor concentración de NA y la concentración de MHPG no se modificó en relación al grupo tratado con vehículo (Gráfica 1). La relación de MHPG/NA fue mayor en el grupo de animales inyectados al día 15 de edad (Gráfica 1). En el hipotálamo medio no se observaron cambios en ningún parámetro (Cuadro 2).



<sup>A</sup>, p<0.05 vs respectivo grupo Vh; <sup>B</sup>, p<0.05 vs grupo DSP<sub>4</sub> RN; <sup>C</sup>, p<0.05 vs grupo DSP<sub>4</sub> 15d (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

**Gráfica 1. Media ± e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y la relación [MHPG]/[NA] en el hipotálamo anterior de ratas tratadas con solución salina (Vh) o con 50 mg/kg PC. de DSP<sub>4</sub> al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

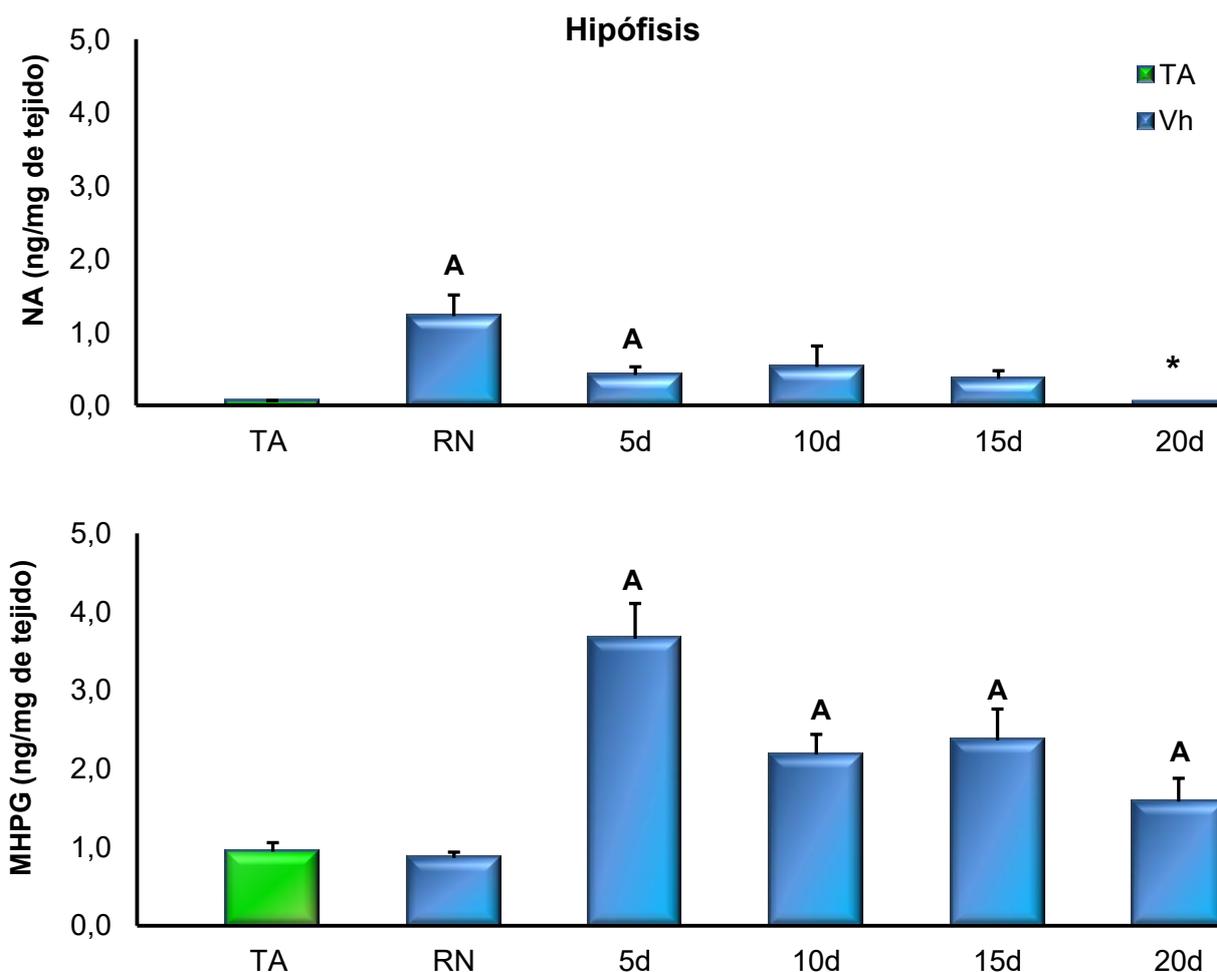
**Cuadro 2. Media  $\pm$  e.e.m de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y la relación [MHPG]/[NA] en el hipotálamo medio de ratas tratadas con solución salina (Vh) o con 50 mg/kg PC. de DSP<sub>4</sub> al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

Grupo	NA	MHPG	[MHPG]/[NA]
<b>RN</b>			
Vh	3.4 $\pm$ 0.7	1.4 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.1
DSP <sub>4</sub>	2.4 $\pm$ 0.6	1.7 $\pm$ 0.4	0.8 $\pm$ 0.1
<b>5d</b>			
Vh	1.7 $\pm$ 0.1	2.2 $\pm$ 0.2	1.3 $\pm$ 0.1
DSP <sub>4</sub>	1.1 $\pm$ 0.2	2.5 $\pm$ 0.2	2.3 $\pm$ 0.5
<b>10d</b>			
Vh	0.9 $\pm$ 0.3	2.9 $\pm$ 0.5	4.0 $\pm$ 1.0
DSP <sub>4</sub>	1.3 $\pm$ 0.1	3.8 $\pm$ 0.4	3.0 $\pm$ 0.4 <sup>A</sup>
<b>15d</b>			
Vh	1.8 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	0.9 $\pm$ 0.1
DSP <sub>4</sub>	1.2 $\pm$ 0.2 <sup>A</sup>	1.9 $\pm$ 0.4	1.6 $\pm$ 0.2
<b>20d</b>			
Vh	2.4 $\pm$ 0.3	1.9 $\pm$ 2.9	0.9 $\pm$ 0.2
DSP <sub>4</sub>	1.9 $\pm$ 0.1	2.9 $\pm$ 0.6	1.6 $\pm$ 0.3 <sup>B</sup>

<sup>A</sup>, p<0.05 vs grupo DSP<sub>4</sub> RN; <sup>B</sup>, p<0.05 vs grupo DSP<sub>4</sub> 10d (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

## A.2 Hipófisis

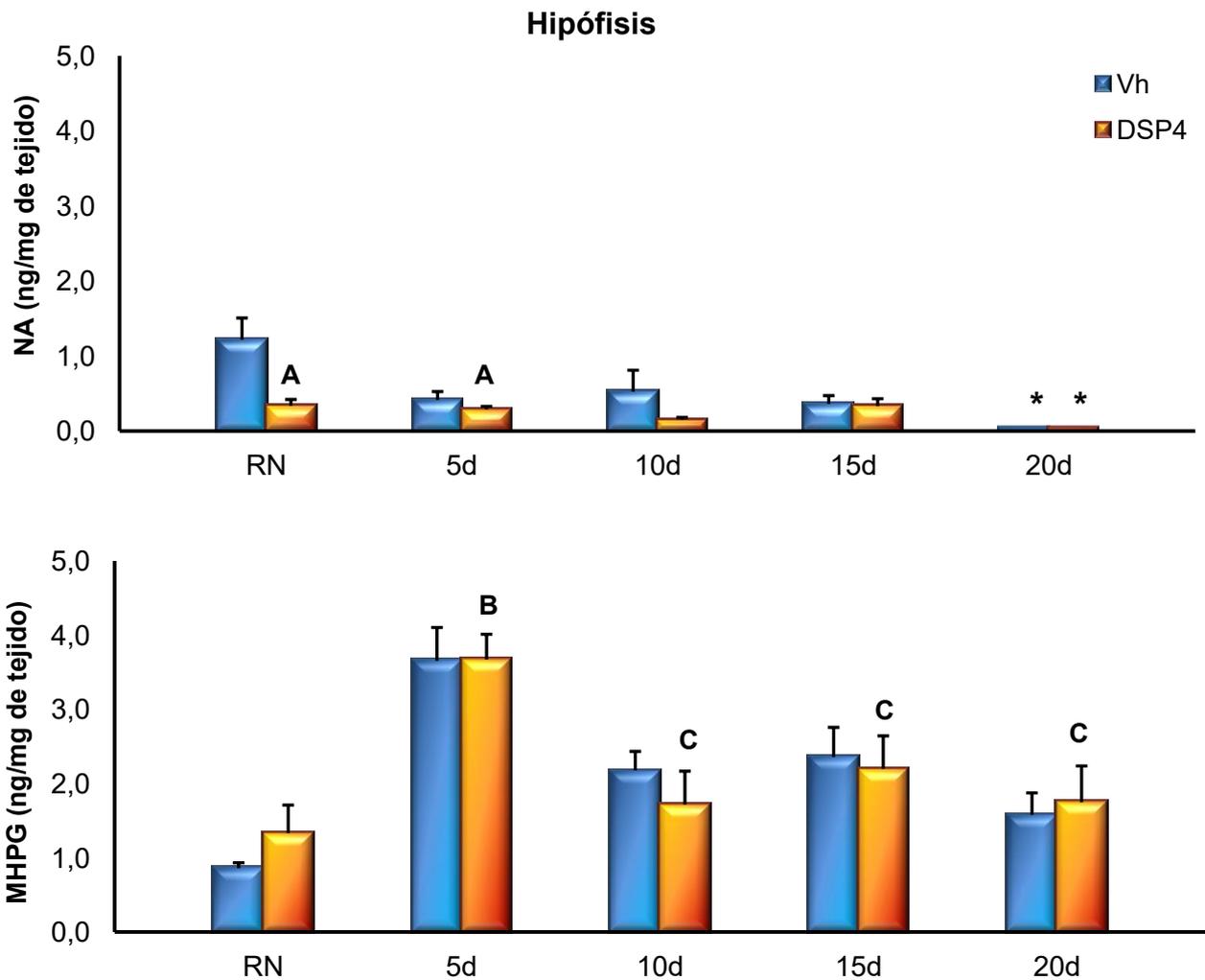
En comparación con el grupo TA, en la hipófisis de los animales que recibieron Vh al nacimiento o al día 5 la concentración de NA fue significativamente mayor y la concentración de MHPG fue mayor en los animales tratados a partir del día 5 de edad (Gráfica 2).



<sup>A</sup>,  $p < 0.05$  vs. Grupo TA (ANOVA seguida de la prueba de Tukey). \* Valores por debajo de la sensibilidad el método (0.001ng/mg de tejido)

**Gráfica 2. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en el hipófisis de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con solución salina (Vh) al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

En comparación con el grupo Vh, la concentración de NA fue menor en el grupo de animales tratados con DSP<sub>4</sub> al nacimiento. La concentración de MHPG no modifico independientemente de la edad en que se bloqueó el sistema noradrenérgico (Gráfica 3).

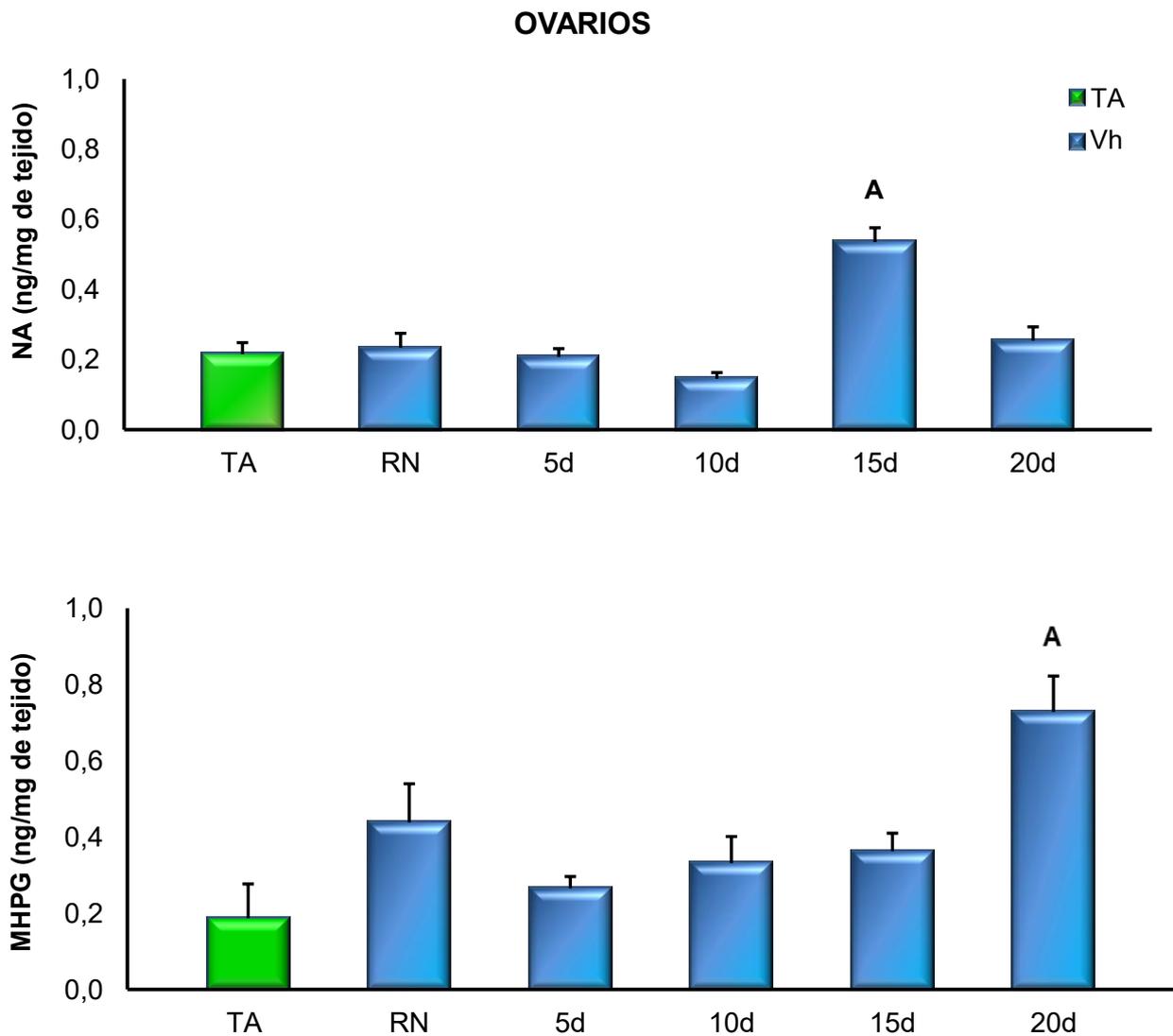


<sup>A</sup>,  $p < 0.05$  vs respectivo grupo Vh; <sup>B</sup>,  $p < 0.05$  vs grupo DSP<sub>4</sub> RN; <sup>C</sup>,  $p < 0.05$  vs grupo DSP<sub>4</sub> 5d (ANOVA seguida de la prueba de Tukey). \* Valores por debajo de la sensibilidad el método (0.001ng/mg de tejido)

**Gráfica 3. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en la hipófisis de ratas tratadas con solución salina (Vh) o con 50 mg/kg PC. de DSP<sub>4</sub> al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

### A.3 Ovarios

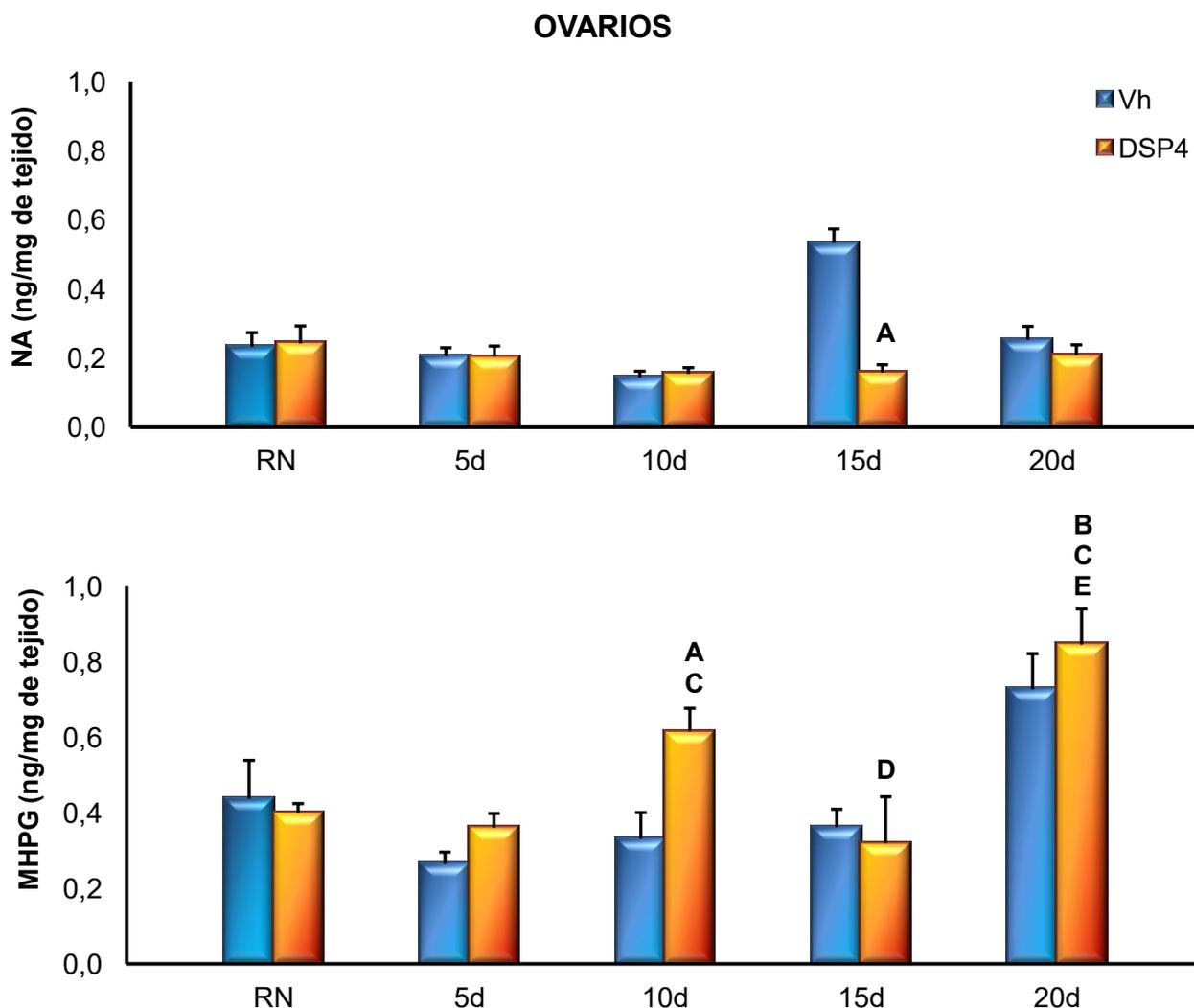
En los ovarios de los animales que se les inyectó Vh al día 15 de edad la concentración de NA fue mayor, mientras que MHPG fue mayor en el grupo tratado al día 20d en relación con el grupo de animales TA (Gráfica 4).



<sup>A</sup>,  $p < 0.05$  vs grupo TA (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

**Gráfica 4. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en los ovarios de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con solución salina (Vh) al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

En comparación con el grupo Vh, la administración de DSP<sub>4</sub> en los animales 15d la concentración de NA fue menor. En cambio la concentración de MHPG fue mayor en el grupo de animales tratados con el neurotóxico al día 10 de edad (Gráfica 5).



<sup>A</sup>,  $p < 0.05$  vs grupo respectivo grupo Vh; <sup>B</sup>,  $p < 0.05$  vs grupo DSP<sub>4</sub> RN; <sup>C</sup>,  $p < 0.05$  vs grupo DSP<sub>4</sub> 5d; <sup>D</sup>,  $p < 0.05$  vs grupo DSP<sub>4</sub> 10d; <sup>E</sup>,  $p < 0.05$  vs grupo DSP<sub>4</sub> 15d (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

**Gráfica 5. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en los ovarios de ratas tratadas con solución salina (Vh) o con 50 mg/kg PC de DSP<sub>4</sub> al día nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

**B. Efectos de la administración de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida sobre la edad de la apertura vaginal, del primer estro y la primera ovulación.**

En comparación con el grupo de animales TA, en los animales con inyección de Vh al nacimiento, la edad de la apertura y del primer estro vaginal fue significativamente mayor. El número de ovocitos liberados fue menor en los animales tratados a partir del día 10 de edad. La tasa de animales ovulantes fue menor independientemente de la edad en que se inició el tratamiento. El peso corporal, de los ovarios y del útero no se modificó (Cuadro 3).

**Cuadro 3. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. de las edades de la apertura vaginal (EAV), del primer estro vaginal (EPE), del número de ovocitos liberados y del peso corporal (PC), de los ovarios y del útero de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con solución salina (Vh) al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

	TA	Vh				
		RN	5d	10d	15d	20d
<b>N</b>	15	15	18	14	11	11
<b>TAO</b>	15/15	8/15 <sup>A</sup>	12/18 <sup>A</sup>	8/14 <sup>A</sup>	6/11 <sup>A</sup>	6/11 <sup>A</sup>
<b>EAV (Días)</b>	36.0 $\pm$ 0.9	41.8 $\pm$ 1.3 <sup>A</sup>	37.3 $\pm$ 0.9	35.2 $\pm$ 0.5	36.5 $\pm$ 1.0	38.0 $\pm$ 0.8
<b>EPE (Días)</b>	37.6 $\pm$ 1.3	44.1 $\pm$ 1.4 <sup>A</sup>	37.8 $\pm$ 0.8	37.9 $\pm$ 0.9	40.0 $\pm$ 1.4	39.8 $\pm$ 0.7
<b>Ovocitos</b>	7.3 $\pm$ 0.8	7.0 $\pm$ 1.0	6.6 $\pm$ 0.8	5.3 $\pm$ 0.6 <sup>A</sup>	9.0 $\pm$ 0.7	7.8 $\pm$ 1.1
<b>PC (g)</b>	110.2 $\pm$ 3.8	123.7 $\pm$ 5.1	121.7 $\pm$ 4.5	113.2 $\pm$ 4.2	116.5 $\pm$ 3.9	113.5 $\pm$ 2.9
<b>Ovarios (mg)</b>	32.0 $\pm$ 2.2	20.9 $\pm$ 2.3	28.8 $\pm$ 2.3	26.6 $\pm$ 3.1	28.0 $\pm$ 4.6	166.6 $\pm$ 18.5
<b>Útero (mg)</b>	178.8 $\pm$ 9.4	183.5 $\pm$ 17.0	185.1 $\pm$ 12.2	167.2 $\pm$ 7.7	174.5 $\pm$ 8.9	166.6 $\pm$ 18.5

<sup>A</sup>, p<0.05 vs grupo TA (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

En comparación con el grupo tratado con vehículo, en el grupo de animales que se les administró DSP<sub>4</sub> a los 10 días de edad se retrasó la edad de la apertura vaginal y el número de ovocitos fue menor en los animales tratados al día 20 (Cuadro 4). No se observaron diferencias significativas en la edad del primer estro vaginal, la tasa de animales ovulantes (Cuadro 4) y en el peso corporal, peso de los ovarios y del útero (Cuadro 5).

**Cuadro 4. Tasa de animales ovulantes (TAO) y media  $\pm$  e.e.m. de la edad de la apertura vaginal (EAV), del primer estro vaginal (EPE), del número de ovocitos liberados de ratas tratadas con solución salina (Vh) o 50 mg/kg PC de DSP<sub>4</sub> al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

Grupo	N	TAO	EAV (días)	EPE (días)	Ovocitos
<b>RN</b>					
Vh	15	8/15	41.9 $\pm$ 1.3	44.1 $\pm$ 1.5	7.0 $\pm$ 1.0
DSP <sub>4</sub>	16	14/16	42.5 $\pm$ 0.9	44.4 $\pm$ 1.0	6.3 $\pm$ 0.8
<b>5 días</b>					
Vh	18	12/18	37.3 $\pm$ 0.9	37.8 $\pm$ 0.9	6.6 $\pm$ 0.8
DSP <sub>4</sub>	16	13/16	37.4 $\pm$ 1.2 <sup>B</sup>	38.9 $\pm$ 1.1 <sup>B</sup>	7.1 $\pm$ 0.7
<b>10 días</b>					
Vh	14	8/14	35.2 $\pm$ 0.5	37.9 $\pm$ 0.9	5.4 $\pm$ 0.6
DSP <sub>4</sub>	9	6/9	38.4 $\pm$ 0.8 <sup>A</sup>	39.9 $\pm$ 1.3	5.8 $\pm$ 1.0
<b>15 días</b>					
Vh	11	6/11	36.6 $\pm$ 1.0	40.0 $\pm$ 1.5	9.0 $\pm$ 0.7
DSP <sub>4</sub>	11	9/11	38.0 $\pm$ 1.2 <sup>B</sup>	40.0 $\pm$ 1.4	8.9 $\pm$ 0.6
<b>20 días</b>					
Vh	11	6/11	38.0 $\pm$ 0.9	39.8 $\pm$ 0.8	7.8 $\pm$ 1.1
DSP <sub>4</sub>	11	5/11	41.1 $\pm$ 1.7	41.7 $\pm$ 2.0	4.8 $\pm$ 0.9 <sup>C</sup>

<sup>A</sup>, p<0.05 vs respectivo grupo Vh; <sup>B</sup>, p<0,05 vs grupo DSP<sub>4</sub> RN; <sup>C</sup>, p<0.05 vs grupo DSP<sub>4</sub> 15d (ANOVA seguida de la prueba de Tukey). (Kruskal- Wallis seguida de la prueba de Dunn).

**Cuadro 5. Media  $\pm$  e.e.m. de peso corporal (PC), peso de la masa ovárica y del peso del útero de ratas tratadas con solución salina (Vh) o 50 mg/kg PC. de DSP<sub>4</sub> al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

Grupo	N	PC (g)	Masa Ovárica (mg)	Útero (mg)
<b>RN</b>				
Vh	15	123.7 $\pm$ 5.2	21.0 $\pm$ 2.4	183.48 $\pm$ 17.0
DSP <sub>4</sub>	16	123.9 $\pm$ 4.8	21.6 $\pm$ 1.5	170.93 $\pm$ 14.5
<b>5 días</b>				
Vh	18	121.7 $\pm$ 4.6	28.8 $\pm$ 2.3	185.09 $\pm$ 12.2
DSP <sub>4</sub>	16	114.4 $\pm$ 5.2	25.8 $\pm$ 2.1	172.62 $\pm$ 7.9
<b>10 días</b>				
Vh	14	113.2 $\pm$ 4.2	26.6 $\pm$ 3.2	167.16 $\pm$ 7.7
DSP <sub>4</sub>	9	111.8 $\pm$ 4.1	26.7 $\pm$ 2.1	182.18 $\pm$ 11.1
<b>15 días</b>				
Vh	11	116.4 $\pm$ 3.9	28.0 $\pm$ 4.6	174.51 $\pm$ 9.0
DSP <sub>4</sub>	11	116.0 $\pm$ 5.3	22.8 $\pm$ 3.8	207.79 $\pm$ 16.6
<b>20 días</b>				
Vh	11	113.4 $\pm$ 2.9	166.6 $\pm$ 18.5	166.65 $\pm$ 18.5
DSP <sub>4</sub>	11	22.6 $\pm$ 2.1	165.7 $\pm$ 9.7	110.18 $\pm$ 5.4

**C. Efectos de la administración de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida sobre la concentración sérica de progesterona, testosterona y 17β-estradiol.**

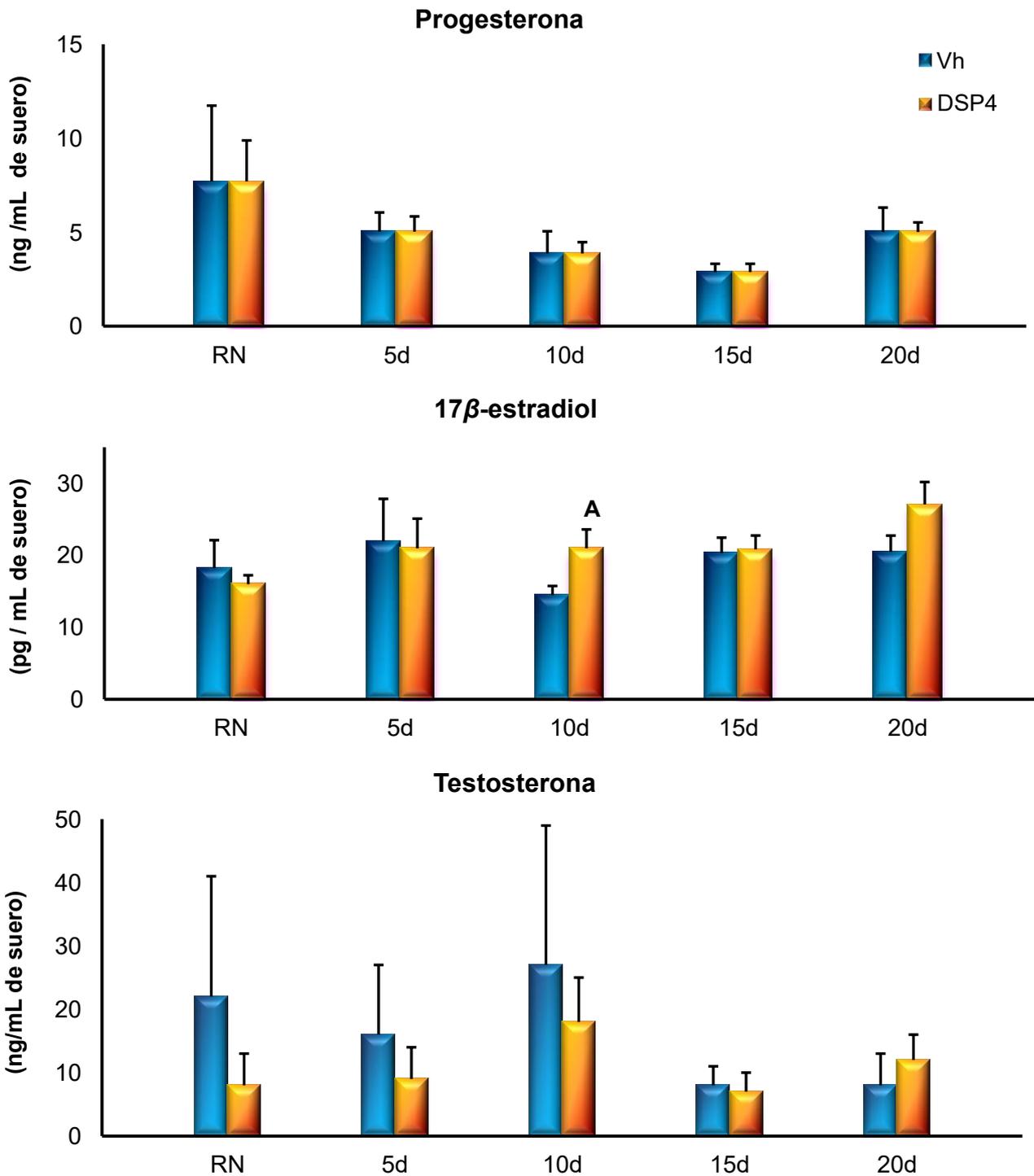
En comparación con el grupo de animales TA, la administración de Vh resultó en una menor concentración de progesterona en el suero de los animales tratados a partir del día 15 de edad. La concentración de estradiol fue mayor independientemente de la edad en que se inició la administración del Vh (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Media ± e.e.m. de la concentración de progesterona (ng/mL), testosterona (ng/mL) y de 17β-estradiol (pg/ml) en el suero de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas con solución salina (Vh) al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

	TA	Vh				
		RN	5d	10d	15d	20d
Progesterona	8.6±1.9	7.7± 4.0	5.0± 1.0	3.9± 1.2	2.9±0.4 <sup>A</sup>	5.0±1.3
Testosterona	21.0±4.0	22.0±19.0	16.0±11.0	27.0±22.0	8.0±3.0	8.0±5.0
17β-estradiol	5.3±0.6	18.2± 3.9 <sup>A</sup>	21.9± 3.9 <sup>A</sup>	14.5± 1.3 <sup>A</sup>	20.3±2.1 <sup>A</sup>	20.5±2.3 <sup>A</sup>

<sup>A</sup>, p<0.05 vs grupo TA (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

En los animales que recibieron DSP<sub>4</sub> la concentración de estradiol fue mayor en el grupo de animales tratados al día 10 de edad con respecto a su respectivo grupo con vehículo, sin modificar la concentración de progesterona y testosterona (Gráfica 6).



A,  $p < 0.05$  vs respectivo Grupo Vh (ANOVA seguida de la prueba de Tukey).

**Gráfica 6. Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración de progesterona, testosterona y de  $17\beta$ -estradiol en el suero de ratas tratadas con solución salina (Vh) o con 50 mg/kg PC de  $DSP_4$  al nacimiento (RN), 5 (5d), 10 (10d), 15 (15d) o 20 (20d) días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.**

## IX. Discusión

Los resultados obtenidos en este estudio nos llevan a pensar que en el animal prepúber de 10 días de edad el sistema noradrenérgico participa de manera estimulante en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad y la secreción de  $17\beta$ -estradiol, a los 20 días de edad en el proceso de ovulación y no participa en dichos proceso al nacimiento, 5 o 15 días postnatal.

El incremento en la edad de la apertura y del primer estro vaginal en el grupo de animales tratados con solución salina al nacimiento, no puede ser explicado por la disminución en la secreción de hormonas esteroides, factores que producen hinchazón, hiperemia y reabsorción de la membrana vaginal (Tramezzani *et al.*, 1963; Mathews *et al.*, 1987; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990), dado que en estos animales la concentración de dichas hormonas no se modificó. Estos resultados nos llevan a pensar que el retraso en el inicio de la pubertad puede atribuirse a la acción del estrés inducido por la inyección peritoneal. Se ha mostrado que en algunas condiciones de estrés agudo resulta en el incremento en la secreción del factor liberador de corticotropina (CRF) y de la hormona liberadora de corticotropina (ACTH), hormonas que en la rata inhiben la secreción de LH (Kinsey-Jones *et al.*, 2010), la maduración sexual (Smith *et al.*, 1971; Ramaley y Schwartz, 1980) y la ovulación (Kinsey-Jones *et al.*, 2010). Es posible que el retraso en el inicio de la pubertad sea resultado de la modificación en la regulación del eje hipotálamo-hipófisis-adrenal inducido por el estrés resultado de la inyección peritoneal. Kinsey-Jones *et al.*, (2010), mostraron que en la rata de 28 días de edad la inyección intracerebroventricular de CRF, retrasa la edad de la apertura vaginal y del primer estro, mientras que la inyección de Astressin B (antagonista de CRF) no la modifica. Dichos resultados llevaron a los autores a pensar que CRF es una vía de señalización esencial en la modulación de los mecanismos neuroendocrino en la regulación del inicio de la pubertad.

En la etapa infantil de la rata existe una mayor sensibilidad hipofisaria a GnRH (Ojeda *et al.*, 1977) que se refleja en la mayor secreción de FSH (Döhler y Wuttke 1974; Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Dicha hormona estimula la incorporación de folículos al grupo en crecimiento, el crecimiento y diferenciación de los folículos que llegarán a ser ovulados en la pubertad (Becú-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). La acción coordinada de las gonadotrofinas y las hormonas esteroides es crucial en el desarrollo de los folículos ováricos, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo

(Domínguez *et al.*, 1991). La disminución en el número de ovocitos liberados en los animales tratados con Vh al día 10 de edad, puede ser resultado de la modificación en la secreción de FSH y LH inducida por el estrés inducido por la inyección intraperitoneal.

El retraso en la edad de la apertura vaginal en los animales tratados con DSP<sub>4</sub> al día 10 de edad no puede ser explicado por la disminución en la secreción del estradiol, dado que en estos animales se observó una mayor concentración de la hormona. Hasta el momento no tenemos una explicación al respecto, sin embargo es posible pensar que el retraso en el inicio de la ovulación es el reflejo de la demora de la secreción preovulatoria de estradiol inducida por una ligera disminución en la actividad de la neurona noradrenérgica en el hipotálamo medio (Figura 10).

El hecho de que en los animales tratados con DSP<sub>4</sub> al día 20 de edad el 45% de los animales presentó ovulación pero su cuenta ovulatoria fue menor, puede ser un reflejo de la disminución en la secreción de las gonadotropinas, inducida por una menor concentración de NA en el hipotálamo anterior. Es posible que al disminuir la información noradrenérgica que llega al hipotálamo anterior, la secreción de FSH y LH sea insuficiente para mantener el desarrollo de los folículos y culminaran con la ovulación. La FSH estimula el reclutamiento de folículos a un grupo de crecimiento (Erickson y Shimasaki, 2001). La LH estimula la maduración final del ovocito, la ruptura del folículo y de la consecuente liberación del ovocito (Chedrese, 2003). Kang *et al.*, (1998) mostraron que en la hembra de 28 días castrada y con implante de estradiol, la administración de DSP<sub>4</sub> resultó en la disminución de la expresión de ARNm en POA, la concentración de GnRH, la expresión del ARNm del receptor a GnRH en la hipófisis y secreción de LH inducida por progesterona, eventos que se acompañan de menor concentración de NA en el hipotálamo. En conjunto estos resultados y el hecho que DSP<sub>4</sub> atraviesa la barrera hematoencefálica, nos permite pensar que el DSP<sub>4</sub> induce neurotoxicidad de las neuronas noradrenérgicas, lo que modifico la secreción de GnRH y como consecuencia de FSH y LH y que al modificarse la vía neural de comunicación entre el hipotálamo y el sistema noradrenérgico, un menor de folículos alcanzaran su etapa preovulatoria (Figura 12).

La disminución en el número de ovocitos liberados en los animales con DSP<sub>4</sub> al día 20, no puede explicarse por modificaciones en el sistema noradrenérgico del ovario, debido a que no se observan cambios en la concentración del NA en el órgano. Estos resultados concuerdan por lo reportado por Rayón (2014) y Salazar (2013) quienes mostraron que la hembra de 25 o 30 días de edad la inyección sistémica del fármaco no modificó la concentración de NA en las gónadas. Se ha mostrado que la fuente de NA en el ovario es la inervación simpática (Burden y Lawrence, 1978) y la síntesis de “*novo*” (Anesetti *et al.*, 2001; D’Albora *et al.*, 2000), además NA regula a nivel local las funciones del ovario (Anesetti *et al.*, 2001; Lara *et al.*, 1999; Paredes *et al.*, 2011). Goldman *et al.*, (1996), mostraron que en la rata adulta en proestro la inyección directa de DSP<sub>4</sub> en la bursa del ovario disminuye o bloquea la ovulación acompañado de una menor concentración de NA en la gónada, mientras que la administración previa de desipramina (inhibidor de la recaptura de NA) disminuye la ovulación y no modifica noradrenalina. Con estos resultados los autores sugieren que el efecto antiovulatorio de DSP<sub>4</sub> es independiente de los cambios en la concentración de la catecolamina y dicha respuesta es resultado de la integridad funcional del proceso de ovulación.

Otra posibilidad es que DSP<sub>4</sub> al actuar en sistema noradrenérgico del ovario en las horas posteriores al tratamiento disminuyó NA y quizá debido a que los animales fueron sacrificados aproximadamente 21 días después del tratamiento (primer estro [41.0±1.7]) es posible que el efecto del neurotóxico sobre la síntesis de la catecolamina ya no es evidente. Sin embargo no se puede descartar que los cambios en ovulación sea resultado de una reorganización funcional de otro sistema de neurotransmisión en el ovario.

Los resultados indican que DSP<sub>4</sub> (administrada sistemáticamente) provoca degeneración de las terminales nerviosas de NA que se originan del *Locus Coeruleus* en el SNC. Dado que DSP<sub>4</sub> al pasar la barrera hematoencefálica y placentaria ejerce acciones neurotóxicas en la neuronas noradrenérgicas, DSP<sub>4</sub> puede servir como una útil herramienta de denervación para el análisis de las funciones de NA, en el SNC de animales adultos y en desarrollo.

A diferencia de lo que ocurre con el bloqueo del sistema noradrenérgico al día 10 o 20, la administración de DSP<sub>4</sub> al nacimiento, 5 o 15 días de edad, no modificó la ovulación, lo que nos permite pensar que dichas diferencias en la respuesta del ovario se debe a que NA participa de manera diferente a lo largo del desarrollo prepuberal. Dicha idea se ha planteado previamente por otros autores (Ojeda y Skinner 2006; Flores *et al.*, 1990).

El incremento en la concentración de estradiol observado en los animales tratados con DSP<sub>4</sub> al día 10 de edad, puede ser resultado de la modificación en la actividad de la enzima P450 aromatasa, proteína que aromatiza a los andrógenos que resulta en la síntesis de estrógenos, inducido por la administración de DSP<sub>4</sub>. Balthazart y Ball (1989) mostraron que en el macho de la codorniz japonesa (*Coturnix coturnix japónica*) castrado y tratado con testosterona, la inyección sistémica de 50 mg/kg pc de DSP<sub>4</sub> incrementa la actividad de la aromatasa en el área preóptica, lo que llevo a pensar que el sistema noradrenérgico participa en la regulación de la aromatasa (Balthazart *et al.*, 1996; Absil *et al.*, 2001), resultados similares se han observado en la glándula hipófisis de la rata (Raum *et al.*, 1984; Canick *et al.*, 1987; Cardinali *et al.*, 1982). Esta idea es apoyada por el hecho que disminuyó la concentración de NA en el HA de los animales tratados con DSP<sub>4</sub> a los 20 días de edad y en el HM de los animales tratados a los 10 días de edad se observó una menor relación de [MHPG]/[NA] (actividad de la neurona noradrenérgica) (Figura 10 y 12).

La disminución en la concentración de NA en el hipotálamo de los animales tratados con DSP<sub>4</sub> al día 15 o 20 de edad, concuerda con el hecho de que este fármaco produce daño a las neuronas noradrenérgicas al formar iones aziridium, ion altamente reactivo que daña a las proteínas de la membrana de la mitocondria y al ADN lo que conduce a la muerte de la célula, daño que se manifiesta aproximadamente después de 30 minutos, que es progresivo y se mantiene por más de tres meses (Szot *et al.*, 2010). El hecho de que en el hipotálamo medio no se modificó la concentración de NA y MHPG, nos permite pensar que existe una inervación diferencial de la información noradrenérgica que llega al hipotálamo (Figura 11 y 12).

Diversos autores han mostrado que los paquetes celulares de las regiones A2, A5 y A7 inervan al hipotálamo (Byrum y Guyenet, 1985; Holets *et al.*, 1988), la región A1 inerva al núcleo dorsomedial y paraventricular del hipotálamo, el hipotálamo lateral, área hipotalámica dorsal, los núcleos supraópticos y la eminencia media (McKeller y Loewy, 1982; Woulfe *et al.*, 1990),. Mientras que la región A6 localizada en el LC inerva el hipotálamo anterior, núcleo paraventricular, área preóptica media y la eminencia media (Helena *et al.*, 2006; Loughlin y Fallon, 1985). Además Holets *et al.*, (1988) proponen que al LC se puede dividir en subdivisiones funcionales que dependientes de la región del *Locus Coeruleus*.

Algunos autores han propuesto que existe selectividad de las neuronas noradrenérgicas a la acción de la bromobenzilamina (Jaim- Etcheverry y Zieher, 1980, Jonsson *et al.*, 1981, Archer *et al.*, 1984, Fritschy y Grzanna 1989, Zhang *et al.*, 1995; Ross y Stenfors, 2015). La administración sistémica de 50 mg/kg de DSP<sub>4</sub> disminuye la concentración de NA en el núcleo del LC y no se observan modificaciones en la región de A1 y A2 (Fritschy *et al.*, 1989).

El hecho que no se modificó la concentración NA en el HM de los animales tratados con DSP<sub>4</sub> no coincide con lo reportado por Salazar (2013) y Rayón, (2014) quienes observan que en el animal de 25 o 30 días la inyección del neurotóxico disminuye la NA en HM. Una posible explicación a dicha diferencia quizá se deba a que en nuestro estudio los animales al nacimiento, a los 5 (etapa neonatal), 10, 15 y 20 días postnatal (etapa infantil) aun presentan inmadurez del sistema noradrenérgico. Algunos autores señalan que en la rata el establecimiento de las conexiones sinápticas de los diferentes sistemas de neurotransmisores se presenta alrededor de la tercera semana de vida posnatal (Herlenius y Lagercrantz, 2004; Rho, *et al.*, 2001; Golden, 1982; Lauder y Bloom, 1975).

Otra posible explicación al hecho que no se modificó la concentración de NA en el HM de los animales, es que exista una neurotoxicidad selectiva entre las neuronas noradrenérgicas que se encuentran en el LC. Zhang *et al.*, (1995) mostraron que en el macho adulto la inyección por tres días consecutivos de con 50mg/kg de DSP<sub>4</sub>, no induce cambios en el número de células inmunoreactivas a DBH en la parte anterior del núcleo LC, en cambio en la parte posterior disminuye la presencia de células marcadas a DBH. Loughlin *et al.*, (1986) concluyeron que los axones noradrenérgicos que llegan al hipotálamo posterior se origina de la región anterior del LC, mientras que las fibras que

llegan al hipotálamo anterior provienen de la región anterior del LC. Sin embargo, hasta el momento no es claro el mecanismo selectivo de neurotoxicidad de DSP<sub>4</sub>.

La disminución en la concentración de NA en la hipófisis observada en los animales tratados con DSP<sub>4</sub> al nacimiento o al día 5 posnatal, permite suponer que existe una relación neural entre el sistema noradrenérgico y la glándula (Figura 9). Bicknell *et al.* (1988) mostró que en la rata macho adulto la hipófisis posterior recibe inervación de la región A2. Además, se ha observado a la tirosina-hidroxilasa, enzima limitante en la síntesis de catecolaminas, en el lóbulo posterior e intermedio la rata, el gato, cerdo y caballo (Saavedra *et al.*, 1975; Müller *et al.*, 1977, Schussler *et al.*, 1992). Por lo anterior es posible pensar que al inyectar de manera sistémica el neurotóxico disminuyó el aporte de NA a la hipófisis proveniente de la región A1, A2 o LC.

El aumento en la concentración de MHPG observado en la hipófisis de los animales con denervación noradrenérgica a partir del día 5 o 20 posnatal no puede ser explicado por una mayor actividad de la catecol-o-metil transferasa, a NA a su metabolito el ácido MHPG. En estudios *in vitro* se ha mostrado que células cardíacas de rata incubadas con DSP<sub>4</sub>, iones aziridium inhiben la acción de COMT, MAO-A y MAO-B dosis dependiente de DSP<sub>4</sub> (Lyles y Callingham, 1981; Landa *et al.*, 1987).

La suma de resultados obtenidos en este estudio nos permite sugerir que durante el desarrollo de la rata prepúber el sistema noradrenérgico participa de manera diferencial en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad y las funciones del ovario.

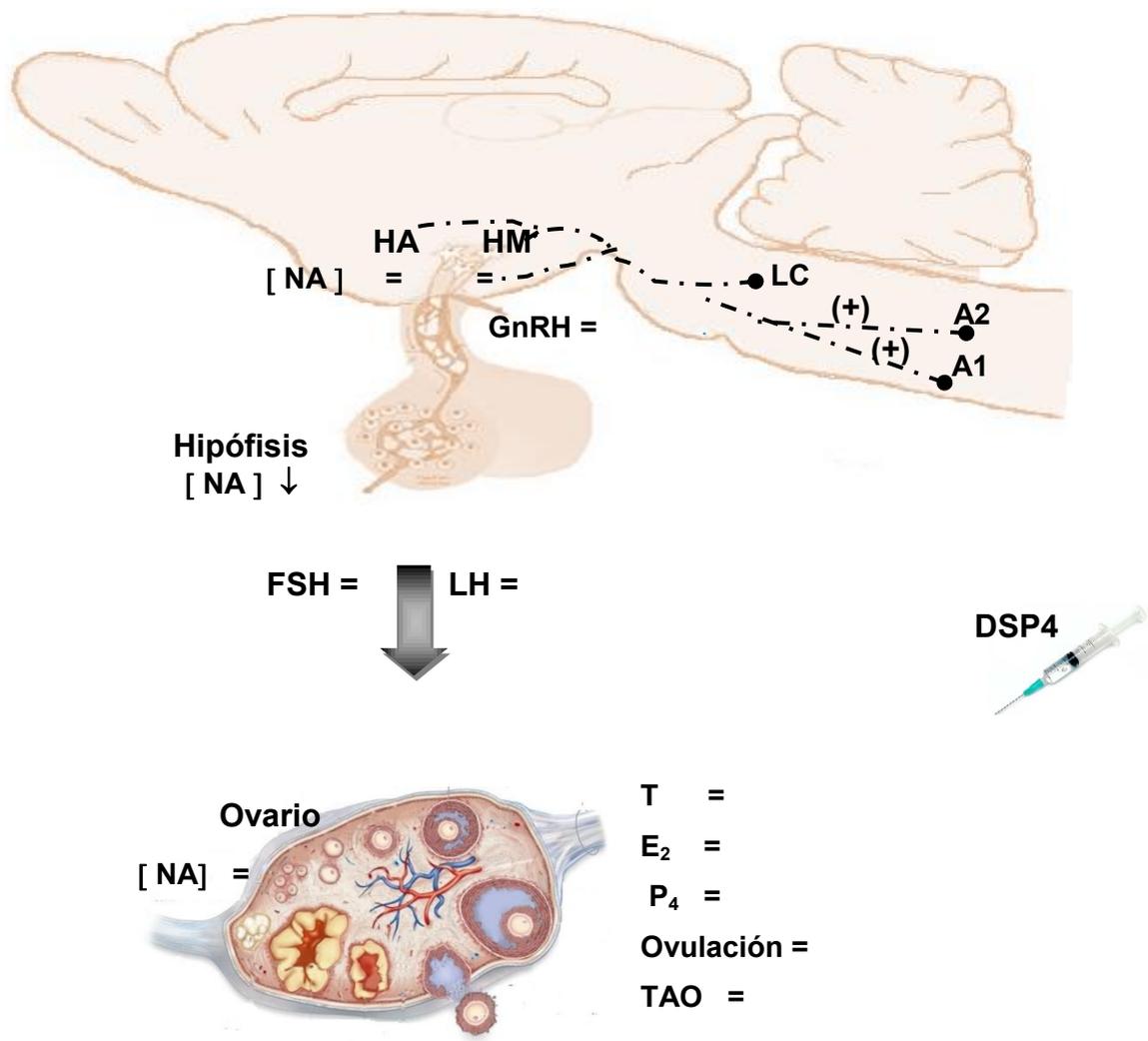


Figura 9. Modelo propuesto de la posible participación del sistema noradrenérgico en el animal al nacimiento o de 5 de edad tratado con N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP<sub>4</sub>). La flecha ↓ indica la disminución, la flecha ↑ indica el incremento, el signo = indica que no hay cambio, el signo (+) indica efectos estimulantes y el signo (-) efectos inhibitorios. *Locus coeruleus* (LC), hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM), noradrenalina (NA), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), progesterona (P<sub>4</sub>), testosterona (T) y estrógenos (E<sub>2</sub>), tasa de animales ovulantes (TAO).

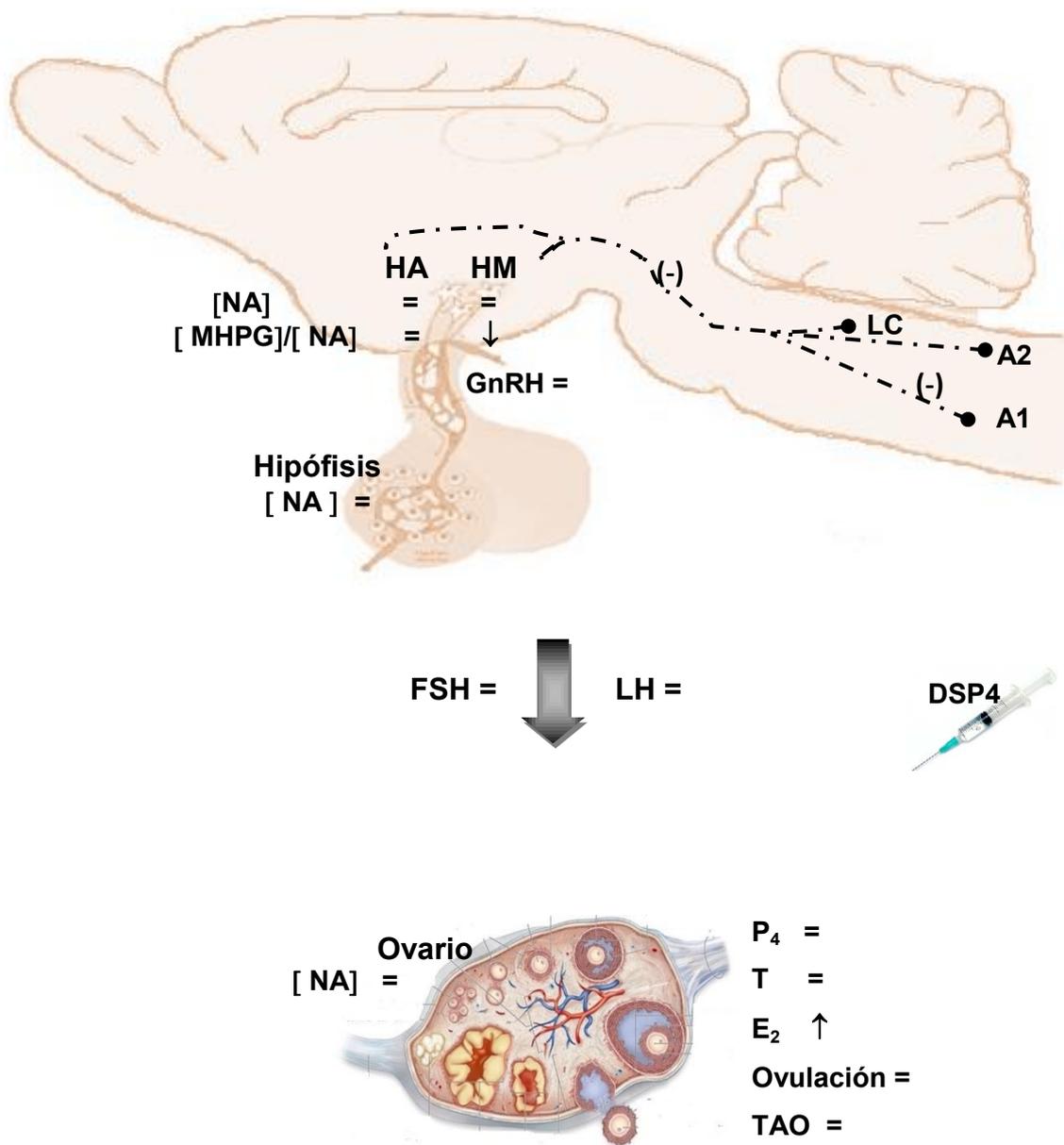


Figura 10. Modelo propuesto de la posible participación del sistema noradrenérgico en el animal de 10 días de edad tratado con N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP<sub>4</sub>). La flecha ↓ indica la disminución, la flecha ↑ indica el incremento, el signo = indica que no hay cambio, el signo (+) indica efectos estimulantes y el signo (-) efectos inhibitorios. *Locus coeruleus* (LC), hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM), noradrenalina (NA), actividad neuronal ([MHPG]/[NA]), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), progesterona (P<sub>4</sub>), testosterona (T), estrógenos (E<sub>2</sub>), tasa de animales ovulantes (TAO) .

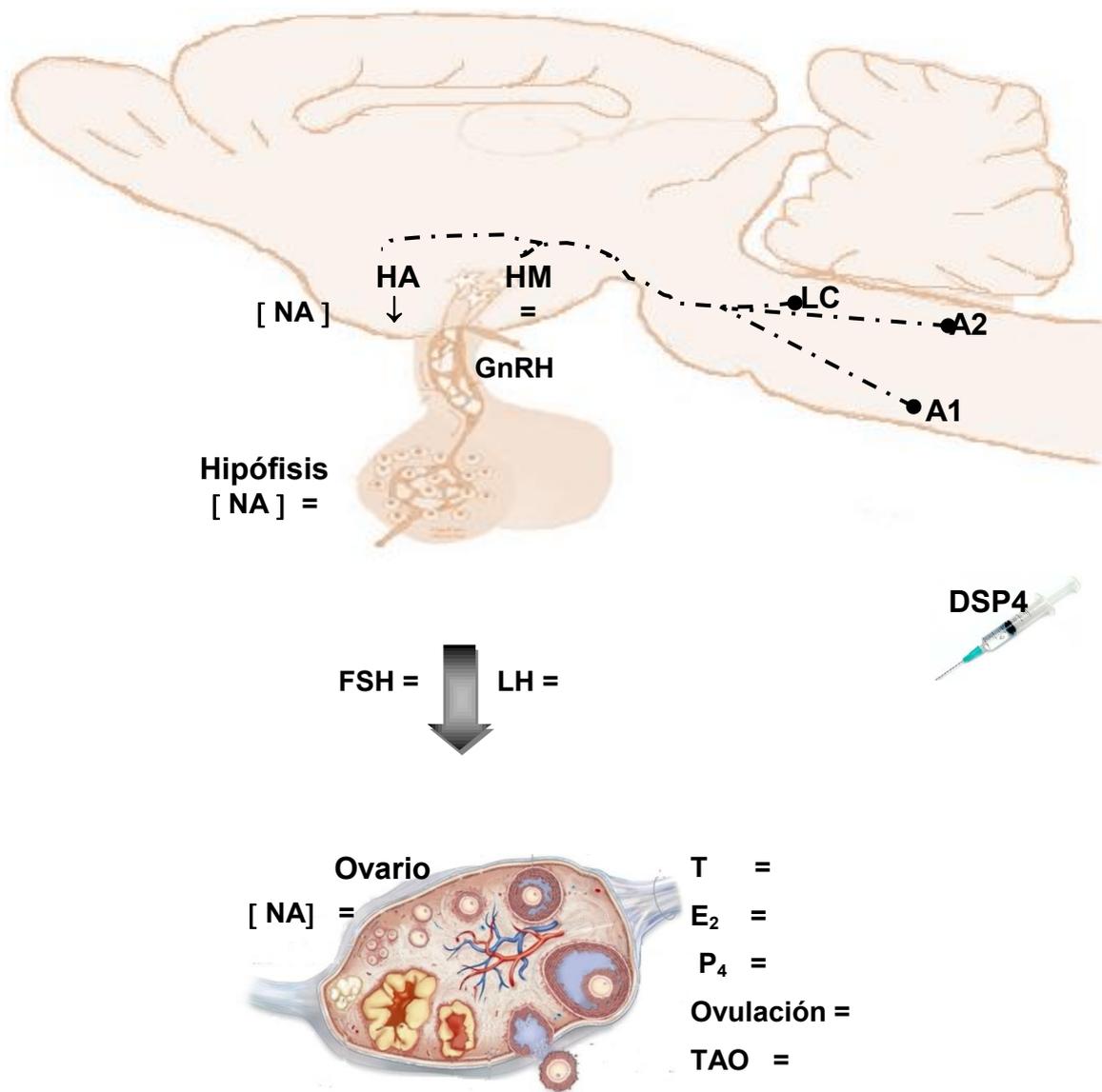


Figura 11. Modelo propuesto de la posible participación del sistema noradrenérgico en el animal de 15 días de edad tratado con N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP<sub>4</sub>). La flecha ↓ indica la disminución, la flecha ↑ indica el incremento, el signo = indica que no hay cambio, el signo (+) indica efectos estimulantes y el signo (-) efectos inhibitorios. *Locus coeruleus* (LC), hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM), noradrenalina (NA), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), progesterona (P<sub>4</sub>), testosterona (T), estrógenos (E<sub>2</sub>), tasa de animales ovulantes (TAO).

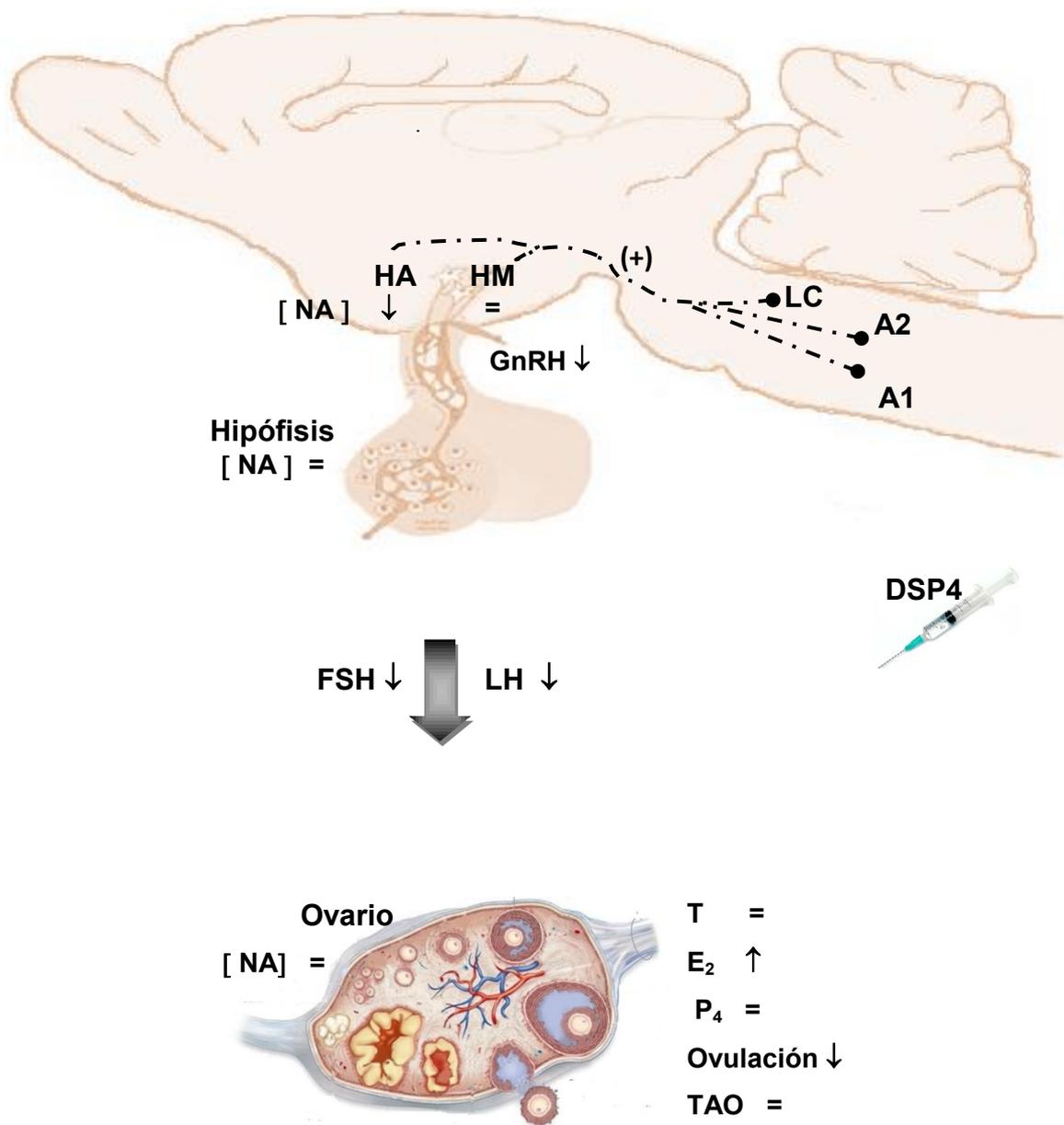


Figura 12. Modelo propuesto de la posible participación del sistema noradrenérgico en el animal de 20 días de edad tratado con N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP<sub>4</sub>). La flecha ↓ indica la disminución, la flecha ↑ indica el incremento, el signo = indica que no hay cambio, el signo (+) indica efectos estimulantes y el signo (-) efectos inhibitorios. *Locus coeruleus* (LC), hipotálamo anterior (HA), hipotálamo medio (HM), noradrenalina (NA), hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), progesterona (P<sub>4</sub>), testosterona (T) y estrógenos (E<sub>2</sub>), tasa de animales ovulantes (TAO).

## XI. Conclusiones

Con base en los resultados obtenidos de este estudio proponemos que:

- En el animal prepúber, el sistema noradrenérgico participa de manera diferencial en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad.
- En el animal prepúber, la administración de N-(2-cloroetil)-N-etil-2-bromobenzilamida afecta de manera diferencial al sistema noradrenérgico del hipotálamo y no modifica al del ovario.
- En la etapa neonatal el sistema noradrenérgico no participa en los mecanismos neuroendocrinos que modulan el inicio de la pubertad y la función de los ovarios.
- En la etapa infantil temprana, el sistema noradrenérgico participa de manera estimulante en la regulación del inicio de la pubertad e inhibitoria en la secreción de  $17\beta$ -estradiol.
- En la etapa infantil tardía, el sistema noradrenérgico ejerce un efecto estimulante en la ovulación.

## **XII. Bibliografía**

1. Absil, P., Baillien M., Ball, GF., Panzica, GC., Balthazart, J. (2001). Review: The control of preoptic aromatase activity by afferent inputs in Japanese quail. *Brain Research Reviews*. 37: 39-58.
2. Adams, LA., Steiner, RA. (1988). Puberty. *Reviews of Reproductive Biology*, 10:1-52.
3. Advis, JP., Andrews, WW., Ojeda, SR. (1978). Relation Of biogenic amines to onset of puberty in the female rat. *Endocrinology*. 103:11-16.
4. Anesetti, G., Lombide, P., D' Alhora, H., Ojeda, SR. (2001). Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell and Tissue Research*. 306: 231-237.
5. Archer, T., Jonsson, G., Ross, SB. (1984). A parametric study of the effects of the noradrenaline neurotoxin DSP4 on avoidance acquisition and noradrenaline neurons in the CNS of the rat. *British Journal of Pharmacology*. 82:249-257.
6. Arechavaleta-Velasco, F., Díaz-Cueto, L., Domínguez-López, P. (2009). Pesticidas organoclorados y sus efectos en la esteroidogénesis ovárica. *Mensaje Bioquímico*. 33:61-69.
7. Aston-Jones, G., Cohen, JD. (2005). An integrative theory of Locus Coeruleus - norepinephrine function: Adaptive gain and optimal performance. *Annual Review of Neuroscience* 28:403-450.
8. Balthazart, J., Ball, GF. (1989). Effects of the noradrenergic neurotoxin DSP-4 on luteinizing hormone levels, catecholamine concentrations,  $\alpha$ 2-adrenergic receptor binding, and aromatase activity in the brain of the japanese quail. *Brain research*, 492:163-175.
9. Balthazart, J., Foidart, A. Absil, P., Harada, N. (1996). Effects of testosterone and its metabolites on Aromatase-Immunoreactive cells in the quail brain: relationship with the activation of male reproductive behavior. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 56: 185-200.
10. Baravalle, ME., Stassi, A., Velazquez, MML., Belotti, M., Ortega, HH., Salvetti, NR. (2013). La falla en la ovulación como un componente de la patogenia de la enfermedad quística ovárica bovina: rol de citoquinas. *Revista FAVE-ciencias veterinarias*. 12: 113-127.

11. Becú-Villalobos, DB., Lacau-Mengido, ML. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Pharmacology Latinoamerican*. 40:1-17
12. Bhattacharya, AN., Dierschke, DJ., Yamaji T., Knobil, E. (1972). The pharmacologic blockade of the circhoral mode of LH secretion in the ovariectomized rhesus monkey. *Endocrinology*. 90:778-86.
13. Bicknell, RK., Dyball, RE., Garten, LL., Heavens, P., Sirinathsinghji, DJS., Zhao, BG. (1988). Evidence for a direct noradrenergic projection from the brain stem to the neural lobe in the rat. *Journal Physiology*. 396: 127p.
14. Birger, W., Bönisch, H. (2009). Interference of the noradrenergic neurotoxin DSP4 with neuronal and nonneuronal monoamine transportes. *Naunyn Shmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 380:523-529.
15. Botella, J. (1995). Mecanismos de la ovulación. En: Botella, J. (1995). *El ovario fisiología y patología*. Ediciones Díaz de Santos, S.A. Madrid. Pp.141-162.
16. Brown, RE. (1994). Neurotransmitter. En: *An introduction to Neuroendocrinology*. Cambridge University Press, Inglaterra, p. 56-87.
17. Burden, HW., Lawrence, LE. (1978). Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. *The Anatomical Records*. 190:233-241.
18. Byrum, CE., Guyenet, PG. (1987). Afferent and efferent connections of the A5 noradrenergic cell group in the rat. *Journal of Comparative Neurology*. 261: 529-542.
19. Canick JA., Tobet SA., Baum, MJ., Vaccaro, DE., Ryan, KJ., Leeman, SE., Fox, TO. (1987). Studies on the role of catecholamines in the regulation of the developmental pattern of hypothalamic aromatase. *Steroids*. 50:509-21.
20. Cardinali, DP., Ritta, MN., Gejman, PV. (1982). Norepinephrine stimulates testosterone aromatization and inhibits 5  $\alpha$ - reduction via  $\beta$ -adrenoreceptors in the rat pineal gland. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 28: 199-209.
21. Carpenter, MB. (1994). *Fundamentos de Neuroanatomía*. 4° edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid. Pp.184-185.
22. Carr, B., Blackwell, R., Azziz, R. (2005). The ovary and the normal menstrual cycle. In: Carr B., Blackwell, R., Azziz R. (eds.). *Essential Reproductive Medicine*. New York: McGraw-Hill. Pp.79.

23. Carr, LA., Voogt, JL. (1980). Catecholamine synthesizing enzymes in the hypothalamus during the estrous cycle. *Brain Research*. 196:437-445.
24. Charli JL., Ponce C., Josep-Bravo P. (1991). Los mecanismos de regulación de la actividad de las neuronas LHRH-érgicas hipotalámicas. En: Domínguez, R. (Ed.). *Tópicos selectos de Biología de la Reproducción*. UNAM-PORRUA, México, 59-85.
25. Chedrese, J. (2003). Regulación autocrina y paracrina del desarrollo folicular I: efectos de los esteroides. *Revista Colombiana Ciencias Pecuarias*. 16: 171-182.
26. Clifton, DK., Steiner, RA. (2009). *Neuroendocrinology of Reproduction*. In Yen & Jaffe's *Reproductive Endocrinology*. Elsevier Inc. pp. 3-33.
27. Conn, PM. 2008. *Neuroscience in Medicine*. 3° edición. Editorial Springer. EUA. Pp. 281.
28. D'Albora, H., Lombide, P., Ojeda, SR. (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell y Tissue Research*. 300: 47-56.
29. Dahlström, A., Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. *Acta Physiologica Scandinavica (Suppl 247)*. 64:1-85.
30. Day, TA., Blessing, W., Willoughby, JO. (1980). Noradrenergic and dopaminergic projections to the medial preoptic area of the rat. A combined horseradish peroxidase/catecholamine fluorescence study. *Brain Research*. 193: 543-548.
31. Döhler, KD., Wuttke, W. (1975). Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology*. 97:898-907.
32. Domínguez, R., Cruz, E., Chávez, R. (1991). Capítulo VII La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: *Tópicos selectos en Biología de la Reproducción*. Miguel Ángel Porrúa. México. Pp. 161-188.
33. Dudley, MW., Howard, BD., Cho, AK. (1990). The interaction of the beta-haloethyl benzylamines, xylamine, and DSP-4 with catecholaminergic neurons. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*. 30: 387-403.
34. Ebeid, TA., Eid, YZ., El-Abd, EA., El-Habbak MM. (2008). Effects of catecholamines on ovary morphology, blood concentration of estradiol-17 $\beta$ , progesterone, zinc, triglycerides and rate of ovulation in domestic hens. *Theriogenology*. 69: 870-876.

35. Erickson, GF., Shimasaki, S. (2001). Physiology of folliculogenesis: the role of the oocyte. *Fertility and Sterility*. 76:943-949.
36. Espey, LL. (1994). Current status of the hypothesis that mammalian ovulation is comparable to an inflammatory reaction. *Biology of Reproduction*. 50: 233-238.
37. Fernández-Guasti, A., Picazo, O. (1992). Changes in burying behavior during the estrous cycle: effect of estrogen and progesterona. *Psychoneuroendocrinology*, 17: 681-689.
38. Flores, A., Ayala, ME., Domínguez, R. (1990). Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the pubertal and adult rat?. *Medical Science Research*. 18: 817-818.
39. Florez, J. (1997). *Farmacología Humana*. 3ª edición. Masson, S.A. Barcelona. Pp. 235-260.
40. Fortune, JE., Armstrong, DT. (1977). Androgen production by theca and granulosa isolated from proestrous rat follicles. *Endocrinology*. 100:1341-1347.
41. Fritschy, JM., Grzanna, R. (1989). Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP-4 identifies two populations of noradrenergic axón terminals. *Neuroscience*. 30: 181-197.
42. Fritschy, JM., Granna, R. (1991). Chapter 20 Selective of DSP4 on Locus Coeruleus axons: are there pharmacologically different types of noradrenergic axón in the central nervous system?. *Brain Research*. 88:257-268.
43. Geneser, F. (2000). Capítulo 21: Sistema endócrino. En: *Histología sobre bases biomoleculares*. 3ra edición. Geneser F (Eds), Editorial Médica Panamericana S.A., Buenos Aires. Pp 581-609.
44. Golden, GS. (1982). A review of the neuroembriology of monoamine systems. *Brain Research Bulletin*. 9: 553-8.
45. Goldman, JM., Stoker, TE., Cooper, RL., McElroy, WK., Parrish, MB. (1996). Suppression of oocyte release in rats by local administration of the noradrenergic neurotoxin DSP4. *Journal of Reproduction and Fertility*. 106:275-283.
46. Gomez-Chang, E., Larrea, F., Martinez-Montes, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteroidogénesis. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*. 15(1): 24-36.

47. Gonzalez, B. (2010). Tesis Doctoral. Caracterización de un modelo de ratón transgénico hipersecretores de hCG que desarrolla tumores gonadales. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
48. Heinz, L., Klaus, M., Lutz, H. (2010). Farmacología: texto y atlas. 6ª edición. Editorial Medica Panamericana. Madrid. Pp. 88-103.
49. Helena, CV., Oliveira, M., Luiz, G., Hayashi, S., Rodrigues, C., Anselmo, JA. (2006). Changes in  $\alpha$ -estradiol receptor and progesterone receptor expresión in the Locus Coeruleus and preoptic area throughout the rat estrous cycle. *Journal of Endocrinology*. 188(2):155-165.
50. Herbison, AE. (1997). Noredrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Reviews of Reproduction*. 2:1-6.
51. Herlenius, E., Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*. 190:S8-21.
52. Hirshfield, A. (1991). Development of follicles in the mammalian ovary. *International Review of Cytology*. 124:43-101.
53. Holets, VR., Hökfelt, T., Rökaeus, Å., Terenius, L., Goldstein M. (1988). Locus coeruleus neurons in the rat containing neuropeptide Y, tyrosine hydroxylase or galanin and their efferent projections to the spinal cord, cerebral cortex and hypothalamus. *Neuroscience*. 24: 893-906.
54. Honma, K., Wuttke, W. (1980). Norepinephrine and dopamine turnover rates in the medial preoptic area and the mediobasal hypothalamus of the rat brain after various endocrinological manipulations. *Endocrinology*. 106:1848-53.
55. Hosny, S., Jennes L. (1998). Identification of  $\alpha$ 1B adrenergic receptor protein in gonadotropin releasing hormone neurones of the female rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 10:687–692.
56. Hughes, ZA., Stanford, SC. (1988). A partial noradrenergic lesion induced by DSP-4 increases extracellular noradrenaline contraction in rat frontal cortex: a microdialysis study in vivo. *Psychopharmacology*. 136:299-303.
57. Irustra, G. (2008). Tesis doctoral. Mecanismo involucrado en la atresia del folículo ovárico: relación entre esteroidogénesis, angiogénesis y apoptosis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

58. Itoh, MT., Ishizuka, B. (2005).  $\alpha$ 1-Adrenergic receptor in rat ovary presence and localization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 240:58-63.
59. Jacobson, W., Wilkinson, M., Gibson, CJ. (1988). Effects of the noradrenergic neurotoxin DSP4 on growth and the gonadal steroid-and PMSG-induced release of LH in the prepubertal female rat. *Brain Research Bulletin*. 20:643-649.
60. Jaim- Etcheverry G., Zieher, LM. (1980). DSP-4: a novel compound with neurotoxic effects on noradrenergic neurons of adult and developing rats. *Brain Research*. 188: 513-523.
61. Jaim-Etcheverry, G. (1998). 2-chloroethylamine (DSP4 and Xylamine). En: Highly selective neurotoxins. Basic and Clinical applications. Edit. R. Kostrzewa. Human Press. EUA. Pp.131-140.
62. Jennes, L., Beckman, WC., Stumpf, WE., Grzanna, R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. *Experimental Brain Research*. 46:331-338.
63. Jonsson, G., Hallman, H., Ponzio, F., Ross. (1981). DSP4 (N-(2-chloroethyl)-N-ethyl-2- bromobenzylamine) a useful denervation tool for central and peripheral noradrenaline neurons. *European Journal of Pharmacology*. 72:173-188.
64. Kaba, H., Saito, H., Otsuka, K., Seto, K., Kawakami, M. (1983). Effects of estrogen on the excitability of neurons projecting from the noradrenergic A1 region to the preoptic and anterior hypothalamic area. *Brain Research*. 274:156-159.
65. Kang, SS., Son, GH., Seong JY., Choi, D., Kwon, HB., Lee, C., Kim, K. (1998). Noradrenergic neurotoxin suppresses gonadotropin-releasing hormone (GnRH) and GnRH receptor gene expression in ovariectomized and steroid-treated rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 10: 911-918.
66. Kerdelhué, D., Boida, F., Lesieur, P., Pasqualine, C., Ei Abed, A., Lenoir, V., Duillet, P., Chiuch, CM., Palkovits, M. (1989). Medial eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology*. 49:176-180.
67. Kinsey-Jones, JS., Li, XF., Knox, AMI., Li YS, Millingan SR., Lightman, O'Byrne, KT. (2010). Corticotrophin- releasing factor alters the timing of puberty in the female rat. *Journal of Neuroendocrinology*. 22: 102-109.

68. Kuhar, MJ., Couceyro, PR., Lambert, PD. (1999). Catecholamines. En: Basic Neurochemistry, Molecular, Cellular and Medical Aspects. GJ., Siegel, BW., Agranoff, RW., Albers, PB., Molinoff (Edits.). Raven Press, New York, EUA. Pp. 243-262.
69. Landa, ME., Rubio, MC, Jaim-Etcheverry, G. (1987). The aziridinium derivative of DSP4 (N-(2-chloroethyl)- N-ethyl- 2- bromobenzylamine) accelerates the beating rate of isolated atria by enhancing the spontaneous release of noradrenaline. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*. 336: 396-402.
70. Lara, HE., McDonald, JK., Ojeda, SR. (1990). Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinology*. 126:364-375.
71. Lauder JM., Bloom, FE. (1975). Ontogeny of monoamine neurons in the locus coeruleus, raphe nuclei and substantia nigra of the rat. II. Synaptogenesis. *Journal of Comparative Neurology*. 163:251-64.
72. Lechin, F., Vander Dijs, B., Hernández-Adrián, G. (2005). Dorsal raphe vs. Median raphe serotonergic antagonism. Anatomical, physiological, behavioral, neuroendocrinological, neuropharmacological and clinical evidences: Relevance for Neuropharmacological Therapy. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 30:564-585.
73. Lee, A., Talley, E., Rosin, DL., Lynch, KR. (1995). Characterization of  $\alpha 2A$  adrenergic receptors in GT1 neurosecretory cells. *Neuroendocrinology*. 62: 215–225.
74. Lintern-Moore, S., Peters, H., Moore G., Faber, M. (1974). Follicular development in the infant human ovary. *Journal of Reproduction and Fertility*. 39:53-64.
75. López, A., Charro, A. (1994). Pubertad normal masculina. En: La pubertad Edits. E. Herrera, C. Pavia, R. Yturriaga. Editores Díaz de Santos. Madrid, España. Pp. 1-15.
76. Loughlin, SE., Foote, SL., Bloom, FE. (1986). Efferent projections of nucleus locus coeruleus: topographic organization of cells of origin demonstrated by three-dimensional reconstruction. *Neuroscience*. 18: 291-306.
77. Loughlin, SE., Fallon, JA. (1985). Locus coeruleus. En: the rat nervous system. Edit. G. Paxinos. Academic Press. Australia. Pp. 79-89.

78. Lyles, GA., Callingham, BA. (1981). The effect of DSP-4 (N-[2-chloroethyl]-N-ethyl-2-bromobenzylamine) on monoamine oxidase activities in tissues of the rat. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 33:632-638.
79. Mardomingo, MJ. (1994). *Psiquiatría del niño y del adolescente: método, fundamentos y síndromes*. Ediciones Diaz de Santos, S.A. Madrid. Pp.114-115.
80. Martins-Afféri, MP., Ferreira-Silva, IA., Franci, C., Anselmo-Franci, JA. (2003). LHRH release depends on Locus Coeruleus noradrenergic inputs to the medial preoptic area and median eminence. *Brain Research*. 61: 521-527.
81. Mathews, D., Andrews, WW., Parker, R., Ojeda, SR. (1987). A role for aromatizable androgens in female puberty. *Biology of Reproduction*. 36:836-843.
82. McGee, E., Hsueh, A. (2000). Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrinology Reviews*. 21:200-214.
83. McKellar, S., Loewy, AD. (1982). Efferent projections of the A1 catecholamine cell group in the rat: an autoradiographic study. *Brain Research*. 241:11-29.
84. Meyerson, BJ., Sawyer, CH.(1968). Monoamines and ovulation in the rat. *Endocrinology*. 83:170-176.
85. Moguilevsky, JA., Wuttake, W. (2001). Changes in the control of gonadotrophin secretion by neurotransmitters during sexual development in rats. *Experimental and Clinical Endocrinology and Diabetes*. 109: 188-195.
86. Moguilevsky, JA., Arias, P. Szwarcfarb, B., Carbone, S., Rondina, D. (1990). Sexual maturation modifies the catecholaminergic control of gonadotrophin secretion and the effect of ovarian hormones on hypothalamic neurotransmitters in female rats. *Neuroendocrinology*. 52:393–398.
87. Monroy, MJ. (1999). Tesis de Maestría. Participación de la inervación serotoninérgica del hipotálamo que origina en el núcleo dorsal y medial del rafe en la primera ovulación. La rata como modelo de estudio. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, División de estudios de Posgrado.
88. Müller, E., Nisticó, G., Scapagnini, U. (1977). *Neurotransmitters and Anterior Pituitary Function*. Academic Press, Inc. New York. Pp. 19-73.
89. Muñoz, CMT., Román, JP. (2011). Pubertad normal y sus variantes. *Pediatra Integral*. XV. 6: 507-518.

90. Neill, JD., Challis, JR., Pfaff, DW., Plant, TM., Kretser, DM., Richards, JA., Wassarman, PM. (2006). *Physiology of Reproduction*. 3° edición. Editorial. Elsevier. EUA. Pp. 3094-3095.
91. Nelson, DR., Koymans, L., Kamataki, T., Stegeman JJ., Feyereisen, R., Waxman, DJ., Waterman, MR., Gotoh, O., Coon, MJ., Estabrook, RW., Gunsalus, LC., Nebert DW. (1996). P450 superfamily: update on new sequences, gene mapping, accession numbers and nomenclature. *Pharmacogenetics* 6: 1-42.
92. Ojeda, SR. (2006). La regulación neuroendocrina de la pubertad normal y precoz: nuevos genes y nuevos conceptos. *Anales de Pediatría*. 64:8-14.
93. Ojeda, SR., Andrews, WW., Advis, JP., Smith-White, S. (1980). Recent advances in the Endocrinology of Puberty. *Endocrine Reviews*. 1:228-257.
94. Ojeda, SR., Urbanski, HF. (1994). Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction* edits. E. Kanabil y JD. Neil. Raven Press. New York, USA. Pp. 363-409.
95. Ojeda, SR., Skinner, MK., 2006. Puberty in the rat. In: Neill, JD. (Ed.). *The Physiology of Reproduction (3rd Edition)*. Academic Press/Elsevier, San Diego. Pp. 2061–2126.
96. Ojeda, SR., Lomniczi A., Mastronardi C., Heger, S., Roth, C., Patent Anne-Simone, Matagne, V., Mungenast, AE. (2006). Minireview: the neuroendocrine regulation of puberty: is the time ripe for a systems Biology approach?. *Endocrinology* 147:1166-1174.
97. Oktay, K., Briggs, D., Gosden, R. (1997). Ontogeny of follicle-stimulating hormone receptor gene expression in isolated human ovarian follicles. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 82:3748-3751.
98. Pagés, G., Aller, J. (2006). *Infertilidad: fisiología, diagnóstico y tratamiento*. Amolca. Caracas. Pp.37-54.
99. Paredes, A., Salvetti, AR., Diaz, AE., Dallard, BE., Ortega, HH., Lara, HE. (2011). Sympathetic nerve activity in normal and cystic follicles from isolated bovine ovary: local effect of beta-adrenergic stimulation on steroid secretion. *Reproductive Biology and Endocrinology*. 9:66-73.
100. Paxinos, G., Watson, C. (1998). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, Spiral Bound.

101. Ramaley, JA., (1979). Development of Gonadotropin Regulation in the Prepubertal Mammal. *Biology of Reproduction*. 20:1-31.
102. Ramaley, JA., Schwartz, NB. (1980). The pubertal process in the rat: The Effect of chronic corticosterone treatment. *Neuroendocrinology*. 30:213-219.
103. Rance, N., Wise, PM., Selmomonoff, MK., Barraclugh, CA. (1981). Catecholamines turnover rates in discrete hypothalamic areas and associated changes in median eminence luteinizing hormone-releasing hormone and serum gonadotropins on proestrus and diestrus day 1. *Endocrinology*. 108:1795-1802.
104. Raum, WJ., Marcano, M., Swerdloff, RS. (1984). Nuclear accumulation of estradiol derived from the aromatization of testosterone is inhibited by hypothalamic beta-receptor stimulation in the neonatal female rat. *Biology of Reproduction*. 30:388-396.
105. Rayon, MP. (2014). Tesis de licenciatura. Efecto de la administración de N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzilamina en el Locus Coeruleus o por vía sistémica sobre el inicio de la pubertad y la primera ovulación. La rata hembra como modelo de estudio. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza.
106. Rho, MJ., Storey, TW. (2001). Molecular ontogeny of major neurotransmitter receptor systems in the mammalian central nervous system: norepinephrine, dopamine, serotonin, acetylcholine and glycine. *Journal of Child Neurology*. 14:271-80.
107. Richards, JS., Liu, Z., Shimada, M. (2008). Immune-like mechanisms in ovulation. *Trends in Endocrinology and Metabolism*. 19:191-196.
108. Rosenzweig, MR., Breedlove, SM., Watson, NV. 2005. *Psicobiología: una introducción a la neurociencia conductual, cognitiva y clínica*. 2º edición. Editorial Ariel. España. p. 577-578.
109. Ross, SB., Johansson, JG., Lindborg, B., Dahlbom, R. (1973). Cyclizing compounds. I. Tertiary N-(2-bromobenzyl)-N-haloalkylamines with adrenergic blocking action. *Acta Pharmaceutica Suecica*. 10:29-42.
110. Ross, SB., Renyl, AL. (1976). On the long-lasting inhibitory effect on N-(2-chloroethyl) N-ethyl-2-bromobenzylamine (DSP4) on the active uptake of noradrenaline. *Journal of Pharmacology*. 17: 107-112.

111. Ross, M. (2008). *Histología texto y atlas a color con biología celular y molecular*. 5ª edición 2ª reimpresión. Medica panamericana. Buenos Aires.
112. Ross, S., Stenfors, C. (2015). Dsp4, a Selective Neurotoxin for the Locus Coeruleus Noradrenergic System. A Review of its Mode of Action. *Neurotoxicity Research*. 27:15-30.
113. Saavedra, JM., Palkovits, M., Kizer, JS., Brownstein, M., Zivin, JA. (1975). Distribution of biogenic amine and related enzymes in the rat pituitary gland. *Journal of Neurochemistry*. 25:257-260.
114. Salazar, N. (2013). Efectos de la administración de N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzalamina en el inicio de la pubertad y la ovulación en la rata juvenil. En: *Servicio Social, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM*.
115. Sawyer, CH., Markee, JE., Hollingahead WH. (1947). Inhibition of ovulation in the rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine. *Endocrinology*. 41:395-402.
116. Schussler, N., Bayer, M., Frain, O., Peillon, F., Faucon N. (1992). Evidence of tyrosine hydroxylase mRNA in the anterior and Neurointermediate lobes of female rat pituitary. *Biochemical and Biophysical Research communications*, 189: 1716-1724.
117. Shu-Ping, Y., Voogt, JL. (2000). Mating-activated brainstem catecholaminergic neurons in the female rat. *Brain Research*. 894:159-166.
118. Silverman, AJ., Jhamandas, J., Renaud LP. (1987). Localization of luteinizing hormone-releasing hormone (LHRH) neurons that project to the median eminence. *Journal of Neuroscience*. 7:2312-2319.
119. Smith, MJ., Jennes L. (2001). Neural signals that regulate GnRH neurones directly during the oestrous cycle. *Reproduction*. 122:1-10.
120. Stocco, DM. (2000). The role of the stAR protein steroidogenesis: challenges for the future. *Journal of Endocrinology*. 164:247-253.
121. Szawka, RE., Rodovalho, GV., Monteiro, PM., Carrer, HF., Anselmo-Franci, JA. (2009). Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinising hormone regulation. *Journal of Neuroendocrinology*. 21: 279-291.

122. Szot, P., White, SS., Greenup, JL., Leverenz, JB., Peskind, ER., Raskind, MA. (2006). Compensatory changes in the noradrenergic nervous system in the Locus Coeruleus and hippocampus of postmortem subjects with Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies. *Journal of Neuroscience*. 11:467-478.
123. Szot, P., Miguez, C., White, SS., Franklin, A., Sikkema, C., Wilkinson, CW., Ugedo, L., Raskind, MA. (2010). A comprehensive analysis of the effect of DSP4 on the Locus Coeruleus noradrenergic system in the rat. *Neuroscience*. 166: 279-291.
124. Toledano, A. (2005). El hipotálamo: su complejidad morfológica y su capacidad para dirigir los sistemas reguladores del organismo. *Anales de la Real Academia Nacional de Farmacia*. XVIII: 65-93.
125. Tramezzani, JH., Voloschin, LM., Nallar R. (1963). Effect of a single dose of testosterone propionate on vaginal opening in the rat. *Acta Anatomica*. 52:244-251.
126. Tresguerres, JAF. (2003). *Fisiología humana*. 2° reimpresión. McGRAW-HILL-Interamericana., Madrid, España.
127. Wagner, EJ., Ronnekleiv, OK., Kelly MJ. (2001). The noradrenergic inhibition of an apamin-sensitive, small-conductance Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channel in hypothalamic gamma-aminobutyric acid neurons: pharmacology, estrogen sensitivity, and relevance to the control of the reproductive axis. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*. 299:21-30.
128. Wandji, S., Srsen V., Voss, A., Eppig J., Fortune J. (1996). Initiation in vitro of growth of bovine primordial follicles. *Biology of Reproduction*. 55: 942-948.
129. Wassarman, P., Lui, C., Litscher, E. (1996). Constructing the mammalian egg zona pellucida: some new pieces of an old puzzle. *Journal of Cell Science*. 109: 2001-2004.
130. Weick, RF. (1978). Acute effects of adrenergic receptor blocking drugs and neuroleptic agents on pulsatile discharges of luteinizing hormone in the ovariectomized rat. *Neuroendocrinology*. 26:108-17.
131. Weiner, N., Molinoff, PB. (1999). Catecholamines. En: *Basic Neurochemistry*. (Edits). George, J. Siegel, Bernand. W. Agronoff, MR. Wayne Albers, Perry B. Molinoff. Raven Press New York. Pp. 261.

132. Woulfe JM., Flumerfelt BA., Hrycyshyn AW. (1990). Efferent connections of the A1 noradrenergic cell group: a DBH immunohistochemical and PHA-L anterograde tracing study. *Experimental Neurology*. 109:308-22.
133. Wright, DE., Jennes, L. (1993). Origin of noradrenergic projections to GnRH perikarya-constraining areas in the medial septum-diagonal band and preoptic area. *Brain Research*. 621:272-278.
134. Yen, S., Jaffe, R., Barbieri, R. (2001). *Endocrinología de la reproducción fisiología, fisiopatología y manejo clínico*. 4° edición. Editorial Médica Panamericana. España. Pp. 34-41, 61-64, 213.
135. Yong, JG., Cohen DJ. (1979). The molecular biology of development. En: Noshpitz D. (ed.): *Basic handbook of child psychiatry*. Vol.1. Nueva York, Basic Books Publishers.
136. Zhang X., Zuo, DM., Yu, PH. (1995). Neuroprotection by r (-) deprenyl and N-2-hexyl- N- methypropargylamine on DSP-4, a neurotoxin, induced degeneration of noradrenergic neurons in the rat Locus Coeruleus. *Neuroscience letters*. 186:45-48.
137. Zoller, L., Weisz, J. (1978). Identification of cytochrome P-450, and its distribution in the membrana granulosa of prevulatory follicle using quantitative cytochemistry. *Endocrinology*. 103: 310-313.