



Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Estudios Superiores Zaragoza

Carrera de Biología

**EFFECTO DE LA LESIÓN QUÍMICA UNILATERAL DEL
NÚCLEO *LOCUS COERULEUS* EN LA ETAPA INFANTIL EN
EL INICIO DE LA PUBERTAD DE LA RATA HEMBRA**

TESIS

PARA OBTENER EL TÍTULO DE

BIÓLOGA

PRESENTA

Lucia Ivone Pineda Calderas

Directora de Tesis: Dra. Juana Monroy Moreno

Laboratorio de Pubertad y Neuroquímica de la Unidad de
Investigación en Biología de la Reproducción

Financiado por: DGAPA-PAPIIT IA 201012



Ciudad de México

2019.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Universidad Nacional Autónoma de México

**Facultad de Estudios Superiores
Zaragoza**

Efecto de la lesión química unilateral del núcleo *locus coeruleus* en la etapa infantil en el inicio de la pubertad de la rata hembra

Tesis presentada por: Lucia Ivone Pineda Calderas

Directora de Tesis: Dra. Juana Monroy Moreno

Realizado en el laboratorio de Neuroquímica y de Pubertad de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Unidad Multidisciplinaria de Investigación Experimental Zaragoza, UNAM.

Financiado por: **DGAPA-PAPIIT IA 201012**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

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 **PINEDA CALDERAS LUCIA IVONE**, con número de cuenta **307194514**, de la carrera de Biología, se le ha fijado el día **05 de noviembre de 2019** a las **11:00 hrs.**, para presentar examen profesional, el cual tendrá lugar en esta Facultad con el siguiente jurado:

PRESIDENTE Dra. PATRICIA ROSAS SAUCEDO

VOCAL Dra. JUANA MONROY MORENO

SECRETARIO Dra. MARÍA ELENA AYALA ESCOBAR

SUPLENTE M. en IBSH. ANGÉLICA FLORES RAMÍREZ

SUPLENTE Dr. JUAN JOSÉ RODRÍGUEZ MERCADO

El título de la tesis que presenta es: **Efecto de la lesión química unilateral del núcleo *Locus coeruleus* en la etapa infantil en el inicio de la pubertad de la rata hembra.**

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 26 de septiembre de 2019

DR. VICENTE JESUS HERNÁNDEZ ABAD

DIRECTOR
ZARAGOZA
DIRECCION

V.O. BO.
Dr. JOSÉ LUIS GÓMEZ MÁRQUEZ
JEFE DE CARRERA

RECIBÍ
OFICINA DE EXÁMENES
PROFESIONALES Y DE GRADO

AGRADECIMIENTOS

A la Dra. Juana Monroy Moreno por todo su apoyo confianza y ayuda brindada para la elaboración de la tesis.

A los miembros del jurado:

Dra. Patricia Rosas Saucedo

Dra. Juana Monroy Moreno y

Dra. María Elena Ayala Escobar

M. en IBSH. Angélica Flores Ramírez

Dr. Juan José Rodríguez Mercado

Por sus observaciones y sugerencias realizadas durante la revisión del este escrito.

A la laboratorista Dulce María Hernández Torres de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por su colaboración técnica durante el desarrollo del estudio.

A los M.V.Z. Adriana Altamirano Bautista, Román Hernández Meza y Elizabeth Guzmán Andrade por su asesoría técnica en el área de anestesia y cirugía. Al demás personal del Bioterio de la FES Zaragoza, por el cuidado y mantenimiento de los animales utilizados en este estudio.

DEDICATORIAS

A mis padres (Andrés y Virginia) por su amor, trabajo y sacrificio en todos estos años y ser mi pilar fundamental, gracias a sus consejos y palabras de aliento que me han ayudado a crecer como persona y a luchar por lo que quiero, gracias por enseñarme valores que me han llevado a alcanzar una gran meta. Los quiero mucho.

A mis hermanos (Daniel, Lorena, Ivan) y tíos (Verónica y Federico) gracias por su apoyo y por estar en los momentos más importantes de mi vida.

A mi amor (Eduardo) por acompañarme en este arduo camino, por la comprensión, el apoyo y alentarme a conseguir mis metas.

A mis compañeros (Norma, Gabriela, Jonathan) por ayudarme en la elaboración de este trabajo, y los momentos compartidos dentro y fuera de laboratorio.

INDICE

Resumen.....	i
Introducción.....	1
Organización del sistema GNRHérgico.....	5
Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	6
Foliculogénesis.....	7
Esteroidogénesis.....	10
Ovulación.....	12
El sistema noradrenérgico.....	13
El <i>locus coeruleus</i> en la regulación de la secreción de GnRH.....	16
Planteamiento del problema.....	20
Hipótesis.....	21
Objetivo general.....	22
Objetivos particulares.....	22
Materiales y métodos.....	23
Resultados.....	29
Discusión.....	43
Conclusiones.....	48
Referencias.....	49
Anexos	62

RESUMEN

El principal aporte noradrenérgico del hipotálamo se origina del núcleo *Locus coeruleus* (LC). En la rata adulta el LC modula los mecanismos que regulan la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) y de gonadotropinas y por ende la ovulación. Sin embargo, durante el desarrollo prepuberal no es clara su participación. Por ello, en el presente estudio se analizaron los efectos de la lesión química inducida por la N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP₄, neurotóxico selectivo de neuronas noradrenérgicas) en LC sobre el inicio de la pubertad, la primera ovulación, el peso corporal, de los ovarios y del útero y en la concentración de noradrenalina (NA) y del ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en el hipotálamo y la hipófisis.

Se utilizaron ratas hembras de 20 días de edad de la cepa CII-ZV a las que se les lesionó el LC izquierdo o derecho inducida por la microinyección de 10 o 75 µg de DSP₄, como grupo de comparación se utilizaron animales con operación simulada. A los animales se les registró el día de la canalización vaginal y fueron autopsiaron en el día que presentaron el primer estro vaginal.

En los animales con lesión izquierda o derecha del LC, independientemente de la dosis microinyectada, la edad de la apertura vaginal, del primer estro, el número de ovocitos, el peso corporal, de los ovarios y del útero fueron similares a su respectivo grupo con operación simulada. La tasa de animales ovulantes fue menor en los animales con lesión completa del LC derecho inducida por la microinyección de 75 µg de DSP₄ (42.8% vs. 88.8%, $p < 0.05$).

El hipotálamo anterior de los animales con lesión izquierda inducida con la mayor dosis del neurotóxico, la concentración de NA fue mayor (1.65 ± 0.07 vs. 1.39 ± 0.07 , $p < 0.05$), mientras que en el hipotálamo medio y posterior la concentración fue similar a su respectivo grupo con operación simulada. La concentración de MHPG en el hipotálamo anterior, medio y posterior de los animales con lesión izquierda o derecha fue menor a la sensibilidad del método.

En la hipófisis de los animales con lesión completa independiente de la dosis microinyectada, la concentración de NA y MHPG fue menor a la sensibilidad del método.

Con base en los resultados obtenidos en este estudio nos permiten plantear que en el animal de 20 días de edad (etapa infantil tardía) el sistema noradrenérgico que se origina en el LC izquierdo no participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación, mientras que la información que se origina en el LC derecho participa de manera estimulante en regulación de la respuesta ovulatoria.

INTRODUCCIÓN

La reproducción es el proceso biológico por el cual se generan nuevos organismos, siendo una característica de todas las formas de vida conocidas (Curtis y col., 2008). En los mamíferos el inicio de la función reproductiva, está determinada por un conjunto de factores ambientales, nutricionales, genéticos, etc., interrelacionados que culminan con la pubertad (Adams y Steiner, 1988).

La pubertad se define como la etapa biológica transitoria entre la inmadurez y la madurez sexual, en la que se llevan a cabo una serie de cambios neuroendocrinos y fenotípicos (Calzada y col., 2001). Dicha etapa es regulada por diversos mecanismos neuroendocrinos en los que participan el hipotálamo, la hipófisis y las gónadas.

En la rata hembra la señal externa que evidencia el inicio de la pubertad es el rompimiento del epitelio que recubre la entrada a la vagina, proceso que se presenta alrededor de los 38 a 40 días posnatal (Boyar, 1978; Levasseur, 1977; McCann y col., 1974).

En función de una serie de cambios morfológicos y fisiológicos que se presentan en los componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, Ojeda y Advis (1980) clasifican el desarrollo postnatal, en cuatro etapas: neonatal, infantil, juvenil y peripuberal.

La pubertad y la primera ovulación dependen de la integración y coordinación de una serie de mecanismos neuroendocrinos que suceden en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La manifestación de tales mecanismos es el resultado del desarrollo estructural y funcional de los componentes de dicho eje lo cual se inicia desde el nacimiento y se mantiene durante las diversas fases que caracterizan el desarrollo prepuberal de la rata (Ojeda y Urbanski. 1994).

Neonatal: Inicia con el nacimiento y dura hasta el día siete de vida. En el ovario el crecimiento folicular es independiente a la acción de las gonadotropinas ya que se caracteriza por la insensibilidad del ovario a estas. Existen evidencias que señalan que

la foliculogénesis depende de la inervación del ovario (Malamed y col., 1992). A partir del día cinco, la hormona estimulante del folículo (FSH) comienza a estimular la producción de estradiol a partir de testosterona. La presencia de la α -feto proteína vuelve biológicamente inactivos los estrógenos, debido a que se une fuertemente a ellos impidiendo que estos actúen en el hipotálamo y la hipófisis y se cierre el circuito de control inhibitorio. Al final de esta etapa la respuesta esteroidogénica del ovario a las gonadotropinas se hace evidente. La concentración de FSH que en el nacimiento era baja, comienzan a aumentar durante los 2 primeros días de vida (Döhler y Wuttke 1975), la hormona luteinizante (LH) se mantiene baja y la concentración de estrógenos aumenta por acción de la FSH en el ovario debido a que entre el cuarto y quinto día comienzan a formarse los receptores a FSH y 48 horas después a los de LH (Becú y Lacau, 1990).

En el ovario de la rata neonatal VIP favorece la expresión de los receptores a FSH y la síntesis de aromatasa (Ahmed y col., 1986; Jorgensen y col., 1989; Moshin y pennefather, 1979).

Infantil: Se extiende del día 8 al 21 de edad y se caracteriza por el aumento de la secreción de FSH llegando a sus valores máximos a los 12 días de edad, su aumento estimula el reclutamiento y crecimiento de folículos que llegarán a ovular, evidencias morfológicas indican que el desarrollo folicular ovárico tarda entre 15 a 19 días y el doble de folículos crecen durante esta etapa. Al día 10 y hasta el 20 se da una retroalimentación positiva de estradiol. Al día 15 de vida disminuye la FSH y a partir de este momento su concentración permanece baja hasta la ovulación, además se presentan elevaciones esporádicas de LH en la tarde; estas elevaciones se relacionan con un incremento de catecolaminas. Al finalizar esta etapa se produce una menor concentración de LH, comienza a detectarse inhibina y la desaparición de α -feto proteína, la cual implica un incremento en la concentración de estradiol, el receptor citoplasmático a estradiol en el hipotálamo es igual al observado en ratas adultas. Al día 20 posnatal las elevaciones de LH terminan, debido a que la concentración de estradiol y FSH se incrementan (Döhler y Wuttke, 1975; Meijs y col., 1973).

Juvenil: Comprende del día 22 al 30, se caracteriza por la disminución de la secreción de FSH y LH, los cambios pulsátiles de esta última hormona al final de la etapa incrementan sus valores basales y la amplitud de sus pulsos por la tarde lo que lleva al establecimiento de un ritmo circadiano de secreción. En los ovarios se presentan ondas de crecimiento y atresia folicular, incremento del número de receptores a LH y aunado con el patrón de secreción pulsátil de LH se traduce en una mayor esteroidogénesis (Becú y Lacaú, 1990) (Figura 1).

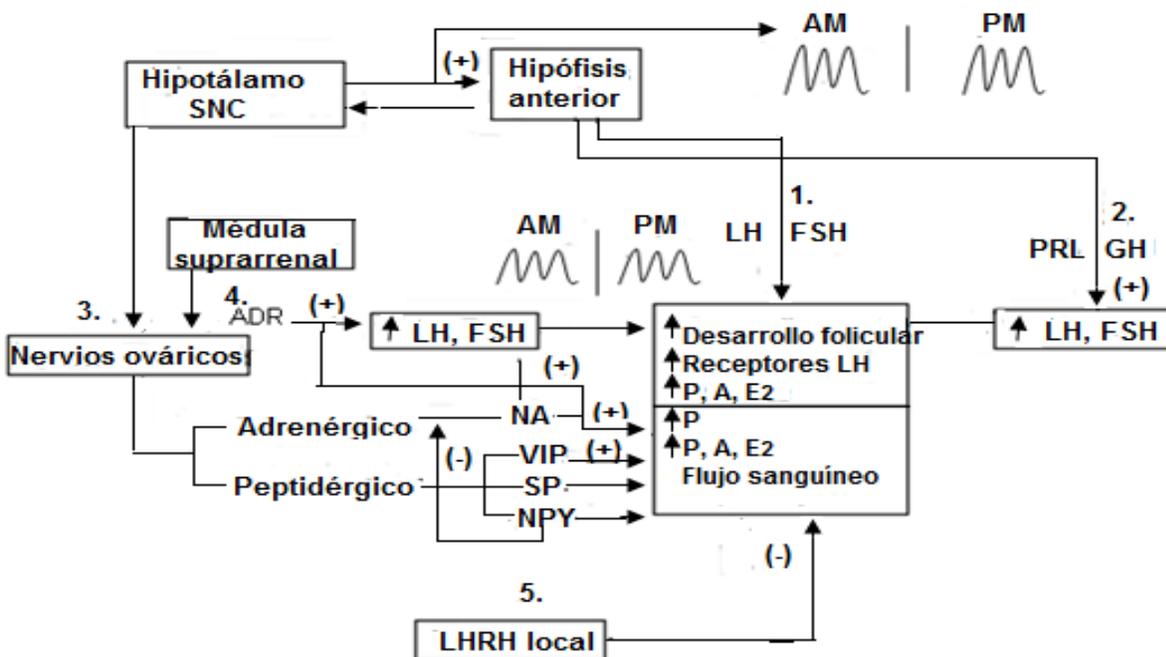


Figura 1. Esquema de la secuencia de eventos hormonales y neurales que ocurren durante la etapa juvenil. Los números indican los diferentes mecanismos de control involucrados en la regulación de la función ovárica. Hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH), hormona luteinizante (LH), hormona estimulante del folículo (FSH), neuropéptido Y (NPY), noradrenalina (NA), péptido intestinal vasoactivo (VIP), sustancia P (SP), prolactina (PRL), hormona del crecimiento (GH), progesterona (P), estradiol (E₂), andrógenos (A), adrenalina (ADR), hormonas que participan en la activación hormonal del eje (Tomada y modificada de Ojeda y col., 1986).

Peripuberal: su duración es variable y culmina con la primera ovulación. Se caracteriza por la maduración del eje hipotálamo hipófisis-ovario. El patrón circadiano de LH se

establece de manera regular. El aumento en los pulsos de secreción de LH y la repetición de picos agudos cada 30-60 minutos son responsables de estimular el ovario e inducir mayor producción de 17- β estradiol. En el ovario existe un mayor número de receptores a FSH y LH, lo que se traduce en un aumento en la concentración de progesterona, testosterona y estradiol (este último responsable de la canalización vaginal). En el hipotálamo, este aumento ejerce un efecto de retroalimentación positiva sobre la secreción de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH) que culmina con la secreción preovulatorio de las gonadotropinas y en consecuencia la primera ovulación. La concentración plasmática de la prolactina y la hormona de crecimiento se incrementan significativamente respecto a la observada en la etapa juvenil (Becú y Lacaú, 1990).

Los esteroides sexuales resultantes de la estimulación de la esteroidogénesis inducen un aumento preovulatorio de LH, FSH y prolactina mediante su acción en el eje hipotálamo-hipófisis (Arata y col., 1981).

Además de las hormonas antes mencionadas, el desarrollo de los eventos que conducen al inicio de la pubertad, están regulados por la información neural que llega a las gónadas. Cuya función es la de modular la diferenciación inicial de los folículos primordiales, facilitando el paso de folículo primordial a folículo primario (Krishna y col., 2000), la regulación del flujo sanguíneo en el ovario (Schultea y col., 1992), la respuesta de las células del folículo a las gonadotropinas (Ahmed, 1986; Kriegsfeld, 2002) y la secreción de progesterona y estradiol (Alm y col., 1980) por medio de la liberación de neurotransmisores como NA, sustancia P (SP), neuropéptido Y (NPY) y péptido vasointestinal (VIP) y enviando información a SNC y modular la secreción de GnRH y de las gonadotropinas (Ahmed, 1986).

ORGANIZACIÓN DEL SISTEMA GNRHÉRGICO

Las neuronas GnRHérgicas, tienen su origen embrionario fuera del hipotálamo, se derivan de la placoda olfatoria durante la gestación temprana; dichas neuronas migran hacia el hipotálamo o como parte del nervio terminal a través de la lámina cribiforme (Silverman y col., 1994). En la rata adulta la GnRH es producida por un número pequeño de neuronas que se encuentran dispersas en la banda diagonal septum medial y el hipotálamo rostral. En el hipotálamo, neuronas parvicelulares de GnRH se encuentran en el núcleo arcuato, el núcleo periventricular, el paraventricular y el área preóptica (Jennes y col., 1997).

Los somas de las neuronas que producen GnRH se localizan en la región del área preóptica media (MPOA), la banda diagonal de Broca, el órgano vasculoso de la lámina terminal, las áreas septales, el hipotálamo anterior y el núcleo arcuato (Arata y col., 1981; Kronenberg y col., 2009). Dichas neuronas son pequeñas, bipolares y fusiformes que forman redes dispersas, sus axones finos que se proyectan predominantemente a la eminencia media (EM) y al tallo infundibular, lugar donde se libera la GnRH (Yen y col., 2001).

La GnRH es un decapeptido (pGlu-His-Trp-Ser-Tir- Gli-Leu-Arg-Pro-Gli CONH₂) con estructura similar en todos los animales (Prieto y Velázquez, 2002). Es sintetizada a partir de una pro-hormona de 92 aminoácidos (Herbison, 1977; Turkstra y Meloen, 2006). Esta molécula está dividida en tres regiones: el péptido señal de 23 aminoácidos, seguido de la secuencia que da origen al decapeptido, seguido de la secuencia Gli-leu-Arg en la posición 11 a 13. El último residuo de 56 aminoácidos llamado como péptido asociado a la GnRH (GAP). La GnRH y GAP son almacenadas en vesículas de secreción, que son transportadas desde el soma a la terminal nerviosa que llega a la eminencia media por transporte axonal (Yen y col., 2001).

En la eminencia media la GnRH 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. La liberación de la GnRH es en pulsos con una frecuencia y

una amplitud propia de cada especie, los cuales son regulados por señales externas o internas al hipotálamo. La GnRH es transportada por el sistema de vasos porta-hipotalámico-hipofisiario hasta los gonadotropos (Prieto y Velázquez, 2002).

La secreción de la GnRH por las células hipotalámicas es regulada por un doble control hormonal y nervioso. El control hormonal se realiza por mecanismos de retroalimentación inhibitorio largos, cortos y ultracortos (Jennes y Conn, 1994). El control neural comprende la regulación de la actividad de la neurona GnRHérgica por otras regiones del SNC vía la liberación de neurotransmisores como la noradrenalina, dopamina y serotonina (Yen y col., 2001). Esto se logra por la interacción sináptica entre los axones de los diferentes sistemas de neurotransmisión y el soma o las fibras nerviosas de la neurona GnRHérgica (Jennes y col., 1982).

La regulación de la amplitud y frecuencia de la GnRH es esencial en la secreción de gonadotropinas (Husulak, 2012). La actividad de la neurona GnRHérgica es baja antes de la pubertad (López, 2012).

EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-OVÁRIO

La regulación de la función reproductora requiere una regulación precisa, cuantitativa y temporal del eje hipotálamo-hipófisis-ovario (López, 2012).

El hipotálamo es el centro integrador de las señales que regulan la síntesis y secreción de las gonadotropinas por la hipófisis vía la GnRH (Prieto y Velázquez, 2002).

En la hipófisis la GnRH inicia su acción con la unión a receptores específicos de la membrana del gonadotropo y activa a la adenilato ciclasa y la fosfolipasa C. Como resultado de la activación de estos sistemas enzimáticos se forman moléculas que actúan como segundos mensajeros como el adenilato ciclasa, el fosfatidil inositol, y el diacil glicerol y la movilización de calcio extra e intracelular, que estimulan a la proteína

cinasa C, que se traduce en el estímulo de la síntesis y liberación de la FSH y LH hacia el torrente sanguíneo (Prieto y Velázquez, 2002).

En el ovario, la FSH y LH se unen a sus receptores de membrana en las células de la granulosa y la teca respectivamente, donde estimulan sus funciones, secreción de hormonas esteroides sexuales, peptidérgicas y factores de crecimiento y la ovulación (Bousfield, 2006; Fawcett y Bloom, 2003).

La FSH estimula la proliferación de las células de la granulosa y la formación de sus propios receptores y los de LH. Ambas gonadotropinas estimulan el crecimiento y la diferenciación del folículo ovárico. La LH en las células de la teca promueven la producción de andrógenos, que al ser aromatizados en la célula de la granulosa forman los estrógenos (Fawcett y Bloom, 2003; Yen y col., 2001).

A su vez las hormonas gonadales al actuar en el hipotálamo y la adenohipófisis regulan la liberación de las gonadotropinas, mediante un mecanismo de retroalimentación (Fink, 1988). También los esteroides gonadales mantienen las condiciones óptimas para la fertilidad por sus efectos en el comportamiento de la cópula y en el desarrollo y mantenimiento del tracto reproductor (Steinetz, 1978).

FOLICULOGÉNESIS

El ovario es un órgano productor de células sexuales femeninas y es una glándula endocrina que sintetiza hormonas esteroides y proteicas (Domínguez y col., 1991). El ovario consta de una médula y una corteza. La médula es la zona interna del ovario la conforman tejido conectivo, vasos sanguíneos y fibras nerviosas que ingresan a la gónada por el hilio. La corteza rodea a la médula y está formada por el estroma y fibras reticulares y de colágeno, a ésta la recubre la túnica albugínea, tejido conjuntivo denso con células fusiformes, el epitelio ovárico, la capa más externa de la corteza está formada por células cúbicas que en algunas partes son casi planas (Ross y Pawlina, 2007).

El desarrollo folicular se clasifica en cinco etapas con base en la morfología del folículo: primordial, primario, secundario, terciario o antral y folículo maduro o preovulatorio (Vantman y Vega, 2010).

Folículo primordial

Los folículos primordiales se encuentran en un estadio de "hibernación", dispuestos en una o dos capas en la zona cortical de la corteza del ovario, inmediatamente por debajo de la túnica albugínea. A cada ovocito lo rodean una capa de células foliculares aplanadas y una membrana basal (células epiteliales y mesenquimales) (Fortoul y Castell, 2010). Estas células establecen uniones denexo entre sí (Ross y Pawlina, 2007).

Folículo primario

El ovocito primario inicia su crecimiento y las células foliculares que lo rodean cambian de forma plana a cúbica que continúan proliferando (Sadler, 2008), formando un epitelio estratificado alrededor del ovocito, formando así al folículo primario y las células foliculares son llamadas células de la granulosa. Dichas células son independientes de la acción de las gonadotropinas y no producen hormonas esteroideas (Cabrero y col., 2007).

Folículo secundario

Durante esta fase las células de la granulosa proliferan y forman capas de células que rodean al ovocito. Se inicia la expresión de receptores a la FSH y el estradiol en las células de la granulosa. El ovocito y las células de la granulosa produce glicoproteínas que se depositan sobre la superficie del ovocito lo que se denomina la zona pelúcida. A medida que el folículo continúa su crecimiento inicia la migración de células mesenquimáticas desde el estroma ovárico lo que da origen a las células de la teca (interna y externa). Pequeñas prolongaciones de las células foliculares atraviesan la zona pelúcida y se interdigitan con las microvelocidades de la membrana plasmática

del ovocito que constituyen la capa vascular interna (Sadler, 2008), por la cual se aporta nutrientes a la granulosa y al ovocito (Cabrero y col., 2007).

Folículo terciario o antral

A medida que continua el desarrollo del folículo aparecen espacios ocupados por líquido folicular (agua, glucosaminoglucanos, proteínas de unión a andrógenos, hormonas esteroideas, factores de crecimiento) entre las células de la granulosa, que posteriormente se unen y forman el antro folicular (Cabrero y col., 2007). El aumento del tamaño del espacio folicular desplaza al ovocito a una posición excéntrica. Las células del epitelio folicular que proliferan en la cavidad del folículo y rodean al ovocito forman el *cumulus ooforus* (disco proliferativo). Las células de la granulosa que rodean al ovocito reciben el nombre de corona radiada (Welsch, 2008).

Folículo maduro o preovulatorio

El folículo preovulatorio se localiza en la superficie del ovario, se caracteriza por poseer diversas capas de células foliculares que rodean al ovocito, el antro folicular y células diferenciadas que forman la teca interna; ésta se compone por células con características de secreción esteroidea que contienen abundantes vasos sanguíneos, mientras que la teca externa gradualmente se va mezclando con el estroma del ovario (Figura 2) (López, 2012).

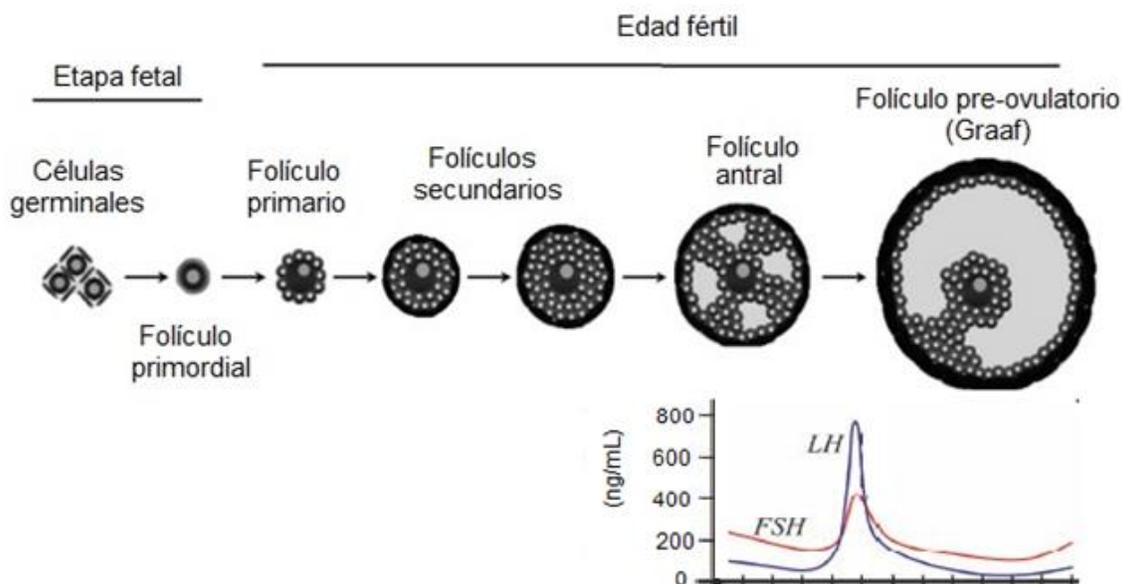


Figura 2. Folliculogénesis. Hormona estimulante del folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), nanogramo por mililitro (ng/mL) (Tomada y modificada de Roper, 2013; Rotemberg y Smaisik, 2009).

ESTEROIDOGÉNESIS

Las hormonas sexuales femeninas producidas en el ovario son fundamentalmente el estradiol y la progesterona, aunque también se producen pequeñas cantidades de estrona, androstendiona, testosterona, 17 α -hidroxiprogesterona y varias hormonas no esteroideas, como la inhibina, relaxina y algunos factores locales (Tresguerres y col., 2005).

El colesterol es sintetizado a partir del acetato o tomado directamente de la circulación general en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) o alta densidad (HDL). El ingreso de LDL a la célula se produce por endocitosis mediada por su receptor de membrana. En el interior de la célula el colesterol se esterifica con ácidos grasos y forma colesterol-éster que se almacena como gotas de lípidos o es transportado al interior de la mitocondria en donde inicia la síntesis de hormonas esteroideas (Vega, 1997).

En la membrana interna de la mitocondria el colesterol se transforma a pregnenolona por acción de la enzima citocromo P450SCC. A partir de la pregnenolona en la vía $\Delta 5$,

actúa la enzima 3β -DH Δ 4,5-isomerasa que da lugar a la progesterona y ésta a la 17-OH progesterona por medio de la enzima P450c17, la enzima 17,20 liasa sintetiza la androstenediona y si sobre esta actúa la enzima aromatasa seguida de la 17-cetoreductasa da lugar al estradiol, si actúa la 17-cetoreductasa directamente sobre la androstenediona se crea la testosterona (Vega, 1997).

En la vía Δ 4-3, la pregnenolona actúa la enzima P450c17 originando la 17-OH pregnenolona, que pasa a dehidroepiandrosterona por la enzima 17,20 liasa, y ésta a androstendiol por la 17cetoreductasa, misma que pasa a testosterona por la 3β -DH Δ 4,5-isomerasa, si sobre esta actúa una reductasa (5α -reductasa) pasa a dihidrosterona y si actúa una aromatasa se sintetiza estradiol. La expresión de la P450 aromatasa se da en respuesta a estimulación de las células de la granulosa por la FSH (Silbernagl y Despopoulos, 2009; Vega, 1997) (Figura 3).

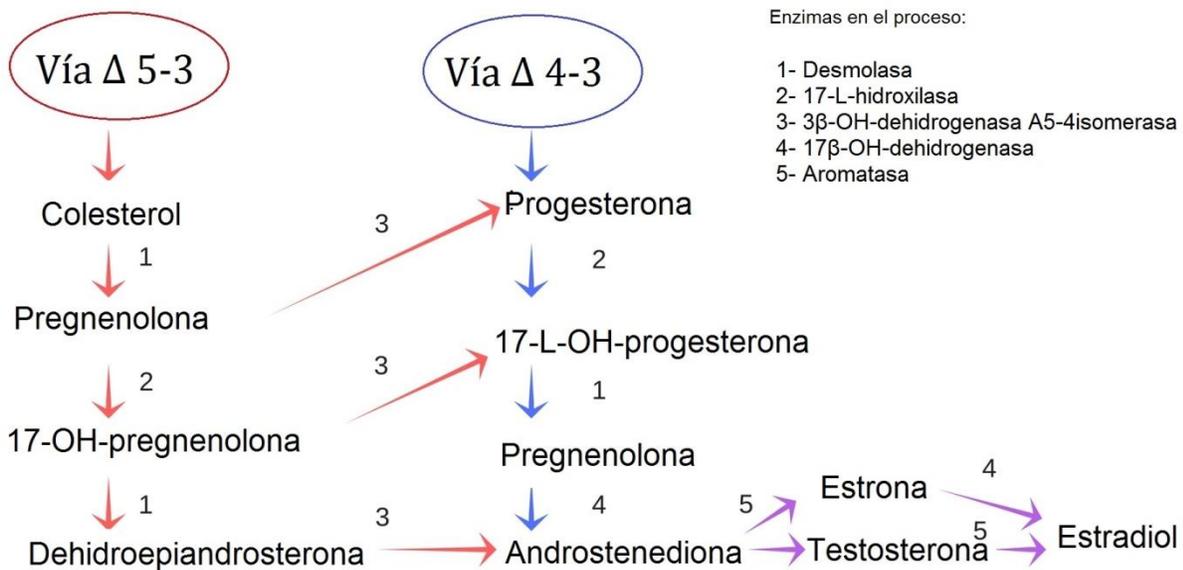


Figura 3. Esquema del proceso de esteroidogénesis (Tomada y modificada de Sosa, 2011).

De acuerdo con la teoría de “dos células, dos gonadotropinas” la producción de estrógenos ováricos depende de la acción coordinada de las células de la teca y de la granulosa vía la acción de las gonadotropinas (Brown, 1999; Sánchez-Criado, 2003). La LH al unirse a su receptor en la célula de la teca estimula a síntesis de andrógenos, los cuales atraviesan la membrana basal del folículo hasta difundir a las células de la

granulosa donde se aromatizan a estrógenos, los cuales se liberan a la circulación o al antro folicular. La capacidad de transformar andrógenos en estrógenos a través de la aromatización es estimulada por la FSH ((Figura 4) (Fernandez y Mangel, 1983).

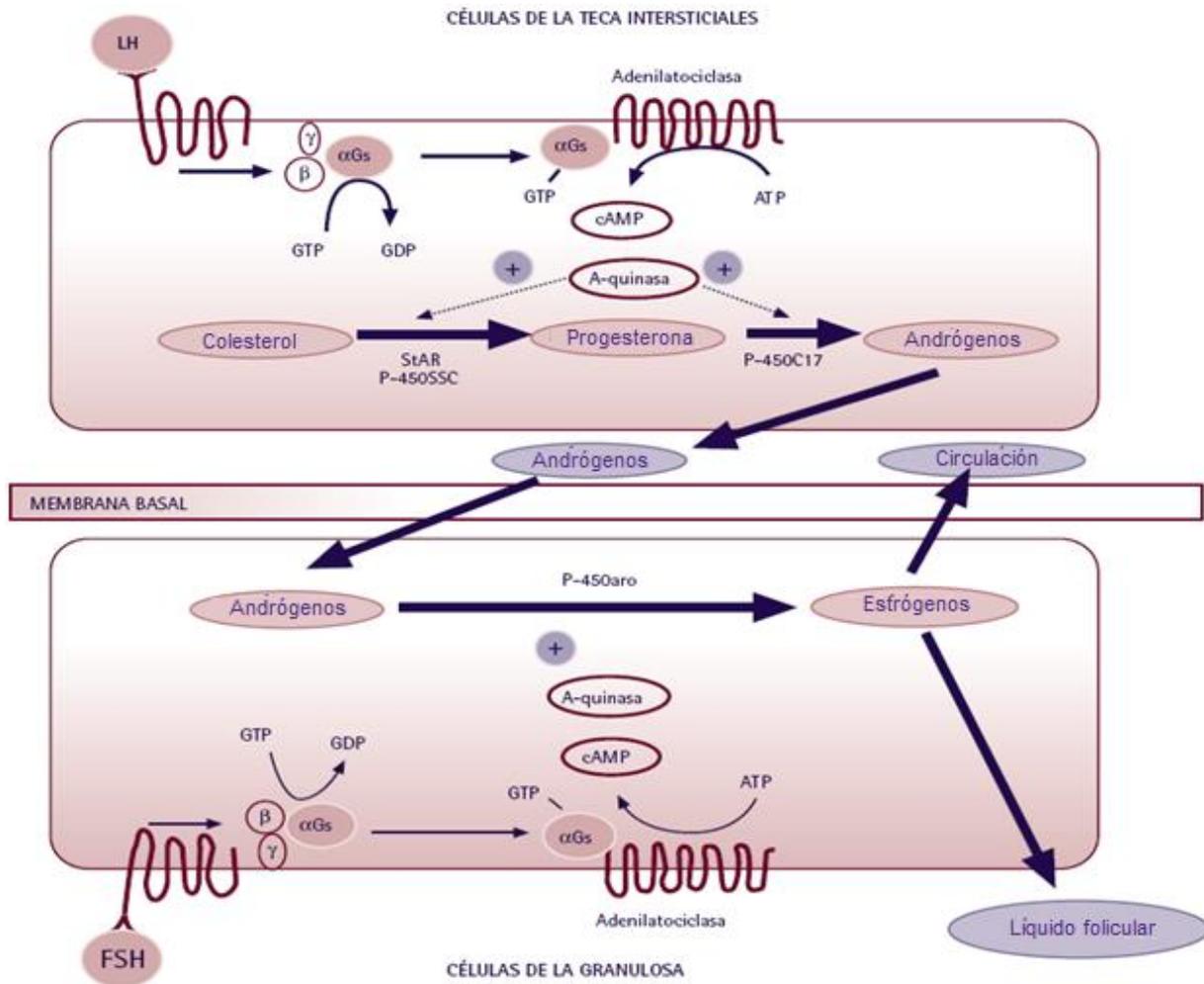


Figura 4. Esquema de la teoría de la doble célula doble hormona y la síntesis de estrógenos (Tomada y modificada de Pombo y col., 2009).

OVULACIÓN

Una vez conseguida la maduración del folículo preovulatorio, se va a producir la liberación del ovocito contenido en su interior conjuntamente con el *cumulus ooforus* que lo rodea, dicho proceso tiene lugar después de la secreción preovulatoria de LH. La ovulación

causa la expulsión del líquido antral y del ovocito desde el ovario a la cavidad peritoneal (Carlson y Bruce, 2014).

En respuesta a la máxima concentración de gonadotropinas, las células de la granulosa y teca sintetizan el activador de plasminógeno. La ruptura de la membrana folicular ocurre por acción del activador del plasminógeno presente en el líquido folicular, que cataliza la conversión de plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica que rompe la membrana basal y actúa sobre el tejido conectivo de la teca y permite la expulsión del ovocito (Tresguerres y col., 2005).

El proceso de la ruptura folicular también está mediado por una “reacción inflamatoria” local dependiente de histamina, por colagenasas o por la contractura folicular inducida por prostaglandinas (Tresguerres y col., 2005). La prostaglandina E y F aumentan en el líquido folicular y alcanzan un pico en el momento ovulatorio (Barón, 2019).

EL SISTEMA NORADRENÉRGICO

Los somas de las neuronas que sintetizan la noradrenalina (NA) se localizan en la región de la médula oblonga, organizada en paquetes celulares denominada A1, A2, A3, A4, A5, A6 y A7. Los axones de estas neuronas inervan regiones del encéfalo como el hipotálamo, córtex, hipocampo y regiones rostrales y como caudales del cerebro se proyectan bilateralmente originando las vías dorsal y ventral, la vía dorsal se origina en el *locus coeruleus* (LC) y la ventral se origina en los núcleos A1, A2, A5 y A7, inervando algunas regiones del cerebro como el hipotálamo, sistema límbico y cerebelo (Ortega y col., 2008) (Figura 5).

El LC es considerado el principal núcleo noradrenérgico, en él se concentran bilateralmente alrededor de 12000 neuronas, cuyos axones forman tractos bien definidos. Las neuronas del LC poseen ramas axonales ascendentes y descendentes. Las ramas descendentes se dirigen a la médula espinal (predominantemente por el cuerno ventral a través del sistema coeruleoespinal) y al tronco cerebral (especialmente al núcleo

sensitivo del trigémino). Las proyecciones ascendentes inervan regiones del diencefalo como la corteza, el tálamo dorsal, el hipocampo con pequeñas proyecciones terminales en el hipotálamo (Valenzuela y col., 2007).

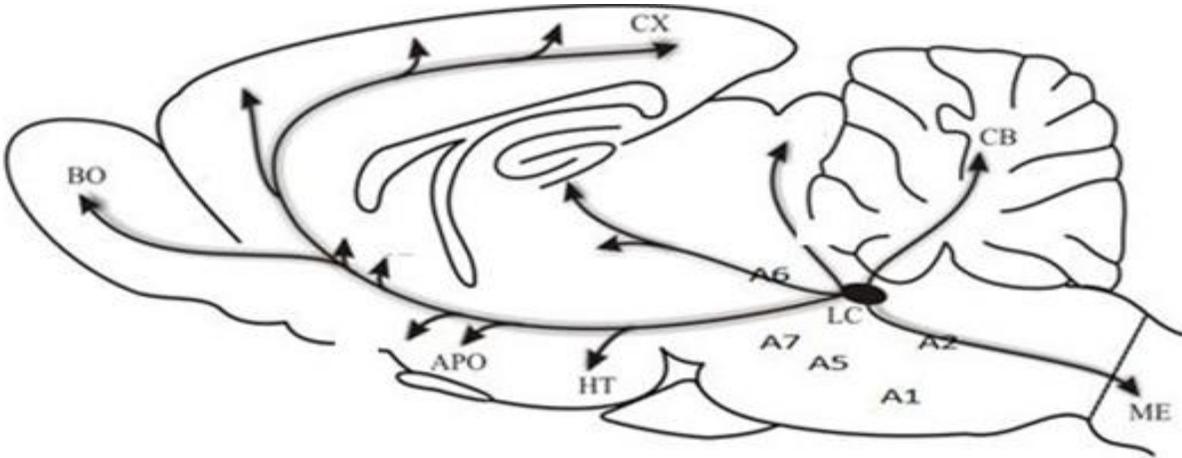


Figura 5. Corte sagital de cerebro de ratona y distribución de paquetes noradrenérgicos A1-A7. Bulbo olfatorio (BO), área preóptica (APO), corteza cerebral (CX), hipotálamo (HT), locus cerúleos (LC), médula espinal (ME), cerebelo (CB) (Tomada y modificada de Herrera y Ávila, 2015).

La NA es un neurotransmisor que pertenece a la familia de las catecolaminas que posee una cadena lateral etil o etanolamina. El catecol es un anillo bencénico con dos sustituyentes hidroxilo en su molécula (Gómez, 2008), se sintetiza a partir del aminoácido no esencial, tirosina, procedente del aminoácido fenilalanina, que se transforma en tirosina en el hígado (Brandana y col., 2010). La tirosina es vertida al torrente sanguíneo. La enzima que cataliza esta reacción es la fenilalanina hidroxilasa. La tirosina que circula por la sangre pasa del vaso sanguíneo al interior de la terminación nerviosa. Aquí se transforma de tirosina en L-dopa o dihidroxifenilalanina. La enzima reguladora es la tirosin hidroxilasa. Esta enzima es la de mayor especificidad y la que existe en menor cantidad de todas. El siguiente paso consiste en la transformación de la Dopa en Dopamina. La enzima que interviene es la L-dopa- descarboxilasa (L-aminoácido- descarboxilasa). El paso de dopamina a noradrenalina es regulado por la dopamina- β -hidroxilasa, dentro de la vesícula sináptica, donde queda almacenada la NA (Figura 6). La liberación del neurotransmisor se realiza por exocitosis en respuesta al estímulo nervioso que induce la entrada de Ca^{2+} (Rothlin y Tessler, 2004).

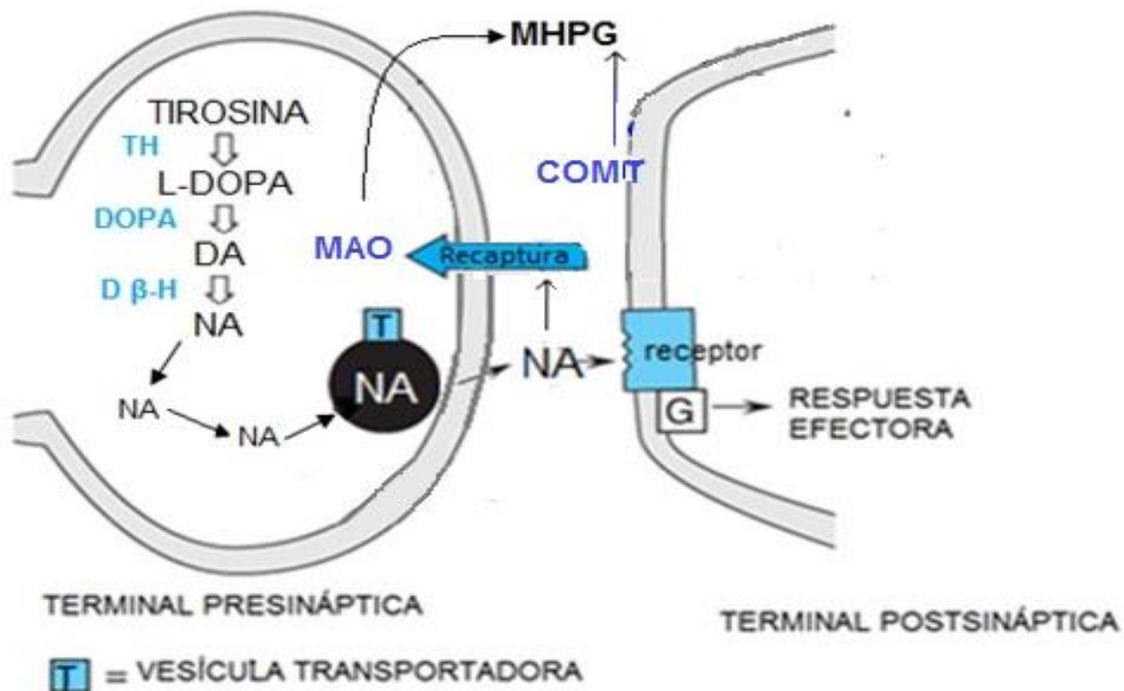


Figura 6. Síntesis, liberación y metabolismo de noradrenalina. Noradrenalina (NA), dopamina (DA), tirosina hidroxilasa (TH), dopamina descarboxilasa, (DOPA), dopamina β-hidroxilasa (Dβ-H), transportador (T), catecol-o-metiltransferasa (COMT), monoamino oxidasa (MAO), ácido 3-metoxi-4-hidroxi- fenilglicol (MHPG) (Tomada y modificada de parkinsonusac, 2010).

La participación de las catecolaminas en la regulación de la secreción de GnRH y de las gonadotropinas ha sido ampliamente estudiada en la rata adulta. La NA es considerada por varios autores como un factor estimulante en la secreción preovulatoria de GnRH, LH, la esteroidogénesis ovárica, el desarrollo folicular y la ovulación (Herbison, 1997; Itóh e Ishizuka, 2005; Lara y col., 1990; Obeid y col., 2008; Prieto y Velázquez, 2002; Rance y col., 1981; Sawyer y col., 1947; Szawka y col., 2009; Yen y col., 2001).

Se han identificado dos familias de receptores a NA, los α y β, que a su vez poseen subtipos: cuatro para α1 (α1A, α1B, α1C y α1D), tres para α2 (α2A, α2B Y α2C) y tres para β (β2, β3). Los receptores adrenérgicos son receptores asociados a un complejo o proteico heterotrimérico llamado proteína G, que activa a segundos mensajeros. La unión de NA a los receptores α2 activa a una proteína Gi, que inactiva la adenilciclase que

disminuye al segundo mensajero intracelular AMPc lo que conlleva a la apertura de un canal de K⁺. En otros sitios promueve el intercambio Na⁺/K⁺ y estimula la fosfolipasa Cβ2 que moviliza el ácido araquidónico y aumenta Ca²⁺. Además, NA al unirse a su receptor α2 en la membrana de la neurona presináptica promueve la despolarización de la membrana y la liberación de esta catecolamina (López y Álamo, 2009).

La inactivación de la NA, se realiza por tres vías. Una parte de la NA es transformada en normetanoradrenalina, por acción de catecol-orto-metil transferasa (COMT), localizada extra neuronal, es convertida en el ácido 3-hidroxi-4-metoxi-mandélico. Otra porción es biotransformada en ácido 3-4dihidroxi-mandélico, que por acción de la monoamino oxidasa (MAO, ubicada intra y extra neuronal), es convertido en ácido 3-hidroxi-4-metoxi-mandélico y otra es transformada en 3,4 dihidroxifenilglicol que por acción de la MAO es metabolizado a 3-hidroxi-4-metoxifenilglicol (HMPG), que es el metabolito más importante de NA (Téllez, 2000).

Además de su distribución en el SNC, la NA se sintetiza en órganos periféricos como la glándula adrenal y los ovarios. En los mamíferos la fuente de aporte de NA en el ovario es la síntesis de *novo* y de la aportada por la inervación que recibe de tipo simpática, parasimpática y sensorial (Ricu y col., 2008).

EL LOCUS COERULEUS EN LA REGULACIÓN DE LA SECRECIÓN DE GONADOTROPINAS

Diversos autores sugieren que en el animal adulto el *locus coeruleus* participa en la regulación de la secreción preovulatoria de la GnRH y de las gonadotropinas (Anselmo-Franci y col., 1997; Bernuci y col., 2008; Dotti y Taleisnik, 1982; Martins-Afféri y col., 2003).

Las principales proyecciones ascendentes noradrenérgicas que se originan del núcleo LC viajan por el tracto ventral en dirección a estructuras del diencefalo como el hipotálamo (Valenzuela y col., 2007).

Anselmo-Franci y colaboradores, (1997) mostraron que en la rata en proestro, la lesión electrolítica del LC disminuye la concentración de FSH, bloquea la secreción preovulatoria de LH y de la ovulación. Dichos resultados llevaron a los autores a concluir que la integridad del LC es esencial en la regulación de la secreción preovulatoria de LH.

Bernuci y colaboradores, (2008) observaron que la lesión electrolítica del LC en animales con síndrome de ovario poliquístico inducido por frío, resultó en la disminución en el número de folículos y menor concentración de estradiol y testosterona, reduce la actividad noradrenérgica del ovario, sin modificar LH. Además, mostraron que el estrés por frío aumenta la actividad de las neuronas noradrenérgicas de LC. Estos resultados llevan a la interpretación que el estrés por frío es un promotor del ovario poliquístico y que depende de la actividad noradrenérgica del ovario y bajo estas condiciones es regulado por la información noradrenérgica del LC.

En animales castrados con implante de estradiol la estimulación eléctrica de LC bloquea la ovulación y la liberación de LH inducida por la estimulación eléctrica del área preóptica anterior (Dotti y Taleisnik, 1982). Resultados semejantes se han reportado en animales en proestro con estimulación del LC (Helena y col., 2002). En conjunto estos resultados permiten pensar que la activación del sistema noradrenérgico del LC inhibe la liberación de LH.

En el estudio de la participación del sistema noradrenérgico se han empleado diversas herramientas que modifican dicho sistema de neurotransmisión como la N-2-cloroetil-N-etil-2-bromobenzilamina (DSP₄), neurotóxina selectiva neuronas noradrenérgicas (Figura 7). Éste atraviesa la barrera hematoencefálica y al llegar a la neurona noradrenérgica interacciona con el receptor a NA que activa al transportador de NA (NAT, por sus siglas en inglés) que al ingresar inactiva al NAT. En el interior de la célula el fármaco interacciona con oxígeno produce un derivado de aziridinio reactivo (DSP₄_{az}) que se acumula en las terminales nerviosas (Ross, 1976).

En el interior de la célula el DSP₄ produce una reacción de alquilación que induce la desnaturalización y cambios en las propiedades de las proteínas y lípidos neuronales, lo que degenera el axón de la neurona noradrenérgica (Ross, 1976; Jonsson y col., 1981). La acción citotóxica del DSP₄ se realiza por la inhibición de la fosforilación oxidativa mitocondrial a través de la inhibición de la síntesis de la nicotinamida-adenina-dinucleótido-fosfato (NADPH, biomolécula relacionada con la óxido-reducción del NADP+), succinato deshidrogenasa y la formación de ATP (Ross y Stenfors, 2015) (Figura 7).

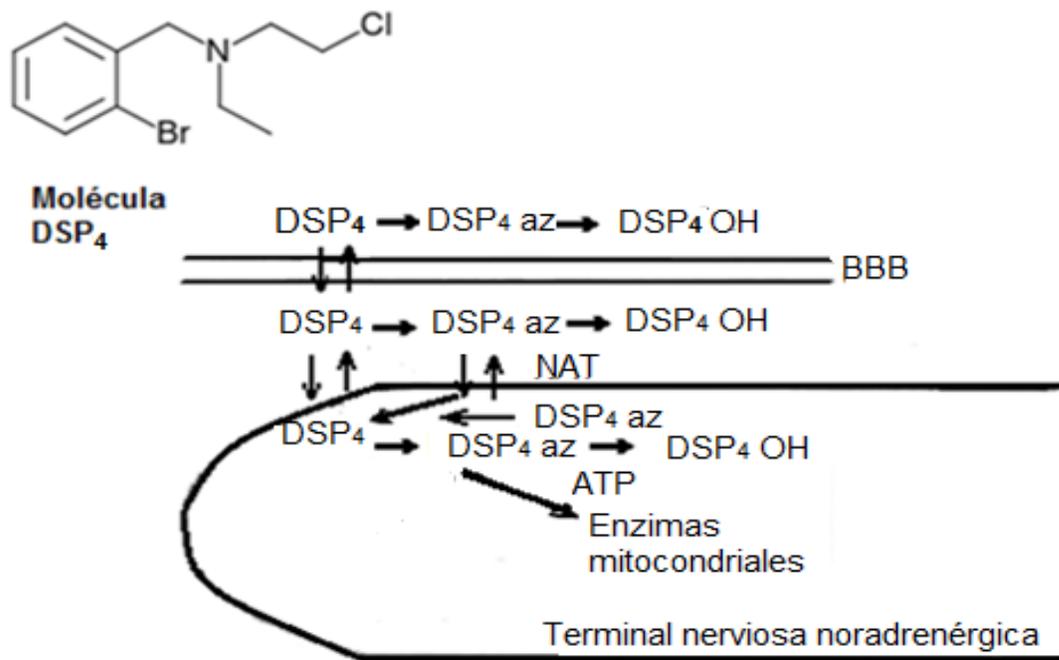


Figura 7. Estructura química y mecanismo de acción del compuesto DSP₄. Aziridinio derivado de DSP₄ (DSP₄az), producto hidrolizado de DSP₄ (DSP₄OH), barrera hematoencefálica (BBB), transportador de noradrenalina (NAT), trifosfato de adenosina (ATP) (Tomada y modificada de Ross, 2015).

La administración de 50 mg/Kg de DSP₄ vía intraperitoneal en la rata adulta resulta en la disminución lenta de la concentración de NA y de la actividad enzimática de la dopamina-β-hidroxilasa en diferentes regiones del sistema nervioso central como la

corteza, el LC, hipotálamo y la médula espinal (Ross y Stenfors, 2015; Fritschy y Grzanna, 1989).

El DSP₄ también atraviesa la barrera placentaria (Jonsson y col., 1981). Su administración a ratas preñadas disminuye entre un 60% y 80% el desarrollo de neuronas noradrenérgicas centrales en las crías, calculándose en el corteza y médula de éstas una reducción endógena (Jonsson y col., 1981). Estos autores sugieren que existe una diferente sensibilidad de las neuronas noradrenérgicas al DSP₄ que depende de la etapa del desarrollo. Sin embargo, no se ha mostrado efectos en órganos periféricos después de la inyección de DSP₄.

En la rata de 30 días de edad (etapa juvenil) la lesión química unilateral de LC inducida por la microinyección de 10 µg/ 1µL de DSP₄ en el LC izquierdo o derecho retrasa la edad de la apertura vaginal, del primer estro y disminuye el número de ovocitos liberados y la concentración de progesterona y 17β-estradiol (Rayón, 2014). Dichos resultados han sido interpretados como prueba de que el sistema noradrenérgico que se origina en el núcleo *locus coeruleus* participa de manera estimulante en los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad y la ovulación.

En estudios recientes del laboratorio se ha mostrado que en la rata de 20 días de edad (etapa infantil) la inhibición del sistema noradrenérgico inducido por la inyección intraperitoneal de 50 mg/Kg de peso corporal de DSP₄, resulta en la disminución en la ovulación, mientras que la inhibición del sistema a los 10 días (etapa infantil) retrasa la edad de la apertura vaginal e incrementa la secreción de estradiol evaluada en el día del primer estro vaginal. Estos resultados llevaron al autor a proponer que el sistema noradrenérgico participa de manera diferencial en la regulación de las funciones del ovario (Acevedo, 2017).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En animal adulto la secreción de GnRH, la esteroidogénesis y la ovulación son estimuladas por la NA que se origina en el núcleo LC (Martins-Aferri y col., 2003). Sin embargo, en la rata prepúber no es clara la participación del neurotransmisor en la regulación de las funciones ováricas.

La inhibición del sistema noradrenérgico inducido por la inyección de 50 mg/Kg de PC en la rata de 20 días de edad disminuyó el número de ovocitos liberados, lo que permitió sugerir que a esta edad el sistema noradrenérgico estimula los mecanismos neuroendocrinos que regulan la primera ovulación (Acevedo, 2017). Sin embargo, hasta el momento no es claro si dichos cambios en la ovulación fueron resultado de la eliminación de los somas noradrenérgicos que se ubican en el núcleo LC, debido a que el neurotóxico al atravesar la barrera hematoencefálica e interactúa con las neuronas ubicadas en los núcleos noradrenérgicos.

Por lo anterior, en el presente estudio se analizó en la rata infantil de 20 días los efectos de la lesión química inducida por la microinyección de DSP₄ en la región derecha o izquierda del núcleo LC sobre el inicio de la pubertad, primera ovulación y la concentración de NA y su metabolito el ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en el hipotálamo y la hipófisis.

HIPÓTESIS

El sistema noradrenérgico participa de manera estimulante en la regulación de la secreción GnRH, las gonadotropinas y las funciones del ovario, por lo tanto, la inhibición del sistema noradrenérgico que se origina en el LC modificará el inicio de la pubertad y la primera ovulación.

OBJETIVO GENERAL

Analizar los efectos de la lesión química unilateral del *locus coeruleus* realizada en la etapa infantil (20 días de edad), sobre el inicio de la pubertad y la primera ovulación.

OBJETIVOS PARTICULARES

Analizar los efectos de la lesión química unilateral del *locus coeruleus* sobre:

- La edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal.
- La primera ovulación.
- El peso corporal, de los ovarios y del útero.
- La concentración de NA y MHPG en el hipotálamo y la hipófisis.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra de 20 días de edad, de la cepa CII-ZV mantenidas en condiciones controladas de iluminación, 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 5:00 a 19:00 h), con libre acceso al agua, al alimento y a la madre hasta el destete (21 días). En todos los casos se siguió lo establecido en la Norma Oficial Mexicana de protección para el uso de animales en experimentación (NOM-062-ZOO-1999, especificaciones técnicas para la protección, cuidado y uso de los animales de laboratorio).

Grupos de 7 a 11 ratas se asignaron al azar a los siguientes experimentos:

- **TESTIGO ABSOLUTO (TA):** Animales sin ningún tratamiento.
- **GRUPO CON VEHÍCULO (Vh):** Animales tratados con solución salina por vía i.p.
- **GRUPO CON ANESTESIA (K+X):** Animales anestesiados con ketamina (40 mg / Kg pc) y xilacina (5 mg / Kg pc) por vía i.p. (Sierra y col., 2009; Kushikata y col., 2011).
- **GRUPO CON OPERACIÓN SIMULADA (OS):** Animales que se les microinyectarán 0.5 μ L / min de solución fisiológica de cloruro de sodio al 0.9% (vehículo) en el núcleo *locus coeruleus* derecho o izquierdo.
- **GRUPO CON LESIÓN:** Animales con lesión unilateral inducida por la microinyección de 10 o 75 μ g / 0.5 μ L de DSP₄ a una velocidad de 1 μ L por minuto en el núcleo *locus coeruleus* derecho o izquierdo.

A los animales de los diferentes grupos experimentales se les registró la apertura vaginal, momento en que se inició la toma de frotis vaginal diario hasta que presentaron el estro vaginal. Los cuales fueron teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina. Los animales fueron sacrificados de las 8:00 a 10:00 h en el día del primer estro vaginal.

La dosis de 10 μ g de DSP₄ microinyectada en el LC fue seleccionada con base a estudios de Rayón (2014) para la rata prepúber y la dosis de 75 μ g de Lin y colaboradores (2011) para ratones adultos.

PROCEDIMIENTO DE MICROINYECCIÓN

Los animales fueron anestesiados con una solución de ketamina (40 mg/Kg pc) (PiSA, México) y xilacina (5 mg/Kg pc) (PiSA, México) vía i.p., se montaron en un aparato estereotáxico (David Kopf Instruments, modelo 9000, USA), se realizó limpieza del área craneal con jabón quirúrgico (Altamirano, México), se realizó una incisión de piel, se perforó el cráneo con una fresa odontológica acoplada a un micromotor (DREMEL, USA) y se introdujo la aguja de microinyección (29X13 mm) conectada a una jeringa Hamilton de 25 μ L, acoplada a una bomba de microinyección (CMA/100, Suecia).

Las coordenadas para introducir la aguja de microinyección hasta la zona de estudio, fueron calculadas tomando como referencia al atlas del cerebro de rata adulta de Paxinos y Watson (1982). Las coordenadas consideradas para el núcleo LC se tomaron con referencia a lamda y de acuerdo al peso corporal que presentaron los animales, fueron las siguientes:

Peso corporal (g)	Anteroposterior (A-P)	Lateral (L)	Ventral (V)
41-45	2.4	1.2	4.9
46-50	2.6	1.1	4.5

con una inclinación de 16° perpendicular a lamda. Una vez concluido el procedimiento quirúrgico a los animales se les administró 1 gota en cada ojo de solución lubricante oftálmica (Sophia, México), fueron colocados en una cama de recuperación con iluminación artificial y cuando recuperaron su movimiento normal fueron regresados a las condiciones controladas de bioterio.

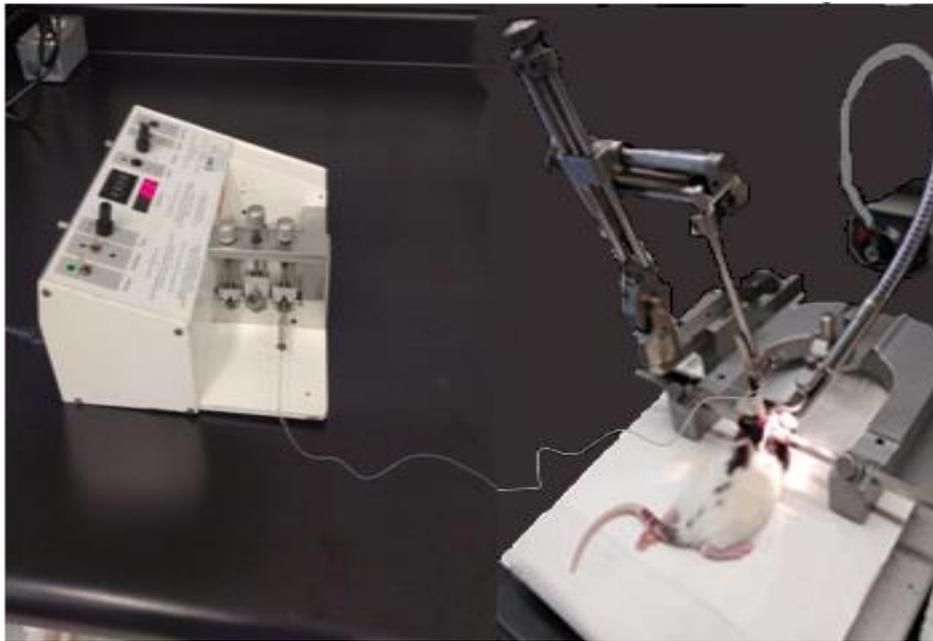


Figura 8. Fotografía del procedimiento de microinyección, sistema de microinyección.

PROCEDIMIENTO DE EUTANACIA

Los animales fueron pesados e inmediatamente sacrificados por decapitación momento en el que se removió inmediatamente el cerebro, se colocó en solución salina (4°C), se congeló con nitrógeno líquido para la disección del hipotálamo anterior, medio y posterior, además se extrajo la hipófisis. Las muestras se almacenaron a -70°C hasta el momento de la cuantificación de NA y de su metabolito por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). La región del tallo cerebral se almacenó a -70°C para la posterior identificación de la trayectoria de la aguja de microinyección. En el momento del sacrificio el útero y los ovarios se disecaron y pesaron en balanza de precisión (AP 250D, OHAUS, USA). Con la ayuda del microscopio estereoscopio (ZEISS, Alemania) se revisaron las trompas uterinas y se contó el número de ovocitos liberados cuando estuvieron presentes.

ANÁLISIS DEL SITIO DE MICROINYECCIÓN

Para la identificación de la trayectoria de la aguja de microinyección en los animales, durante la autopsia se extrajo el cerebro, se colocó en solución fisiológica fría y se procedió a congelarlo en nitrógeno líquido, posteriormente se realizaron cortes coronales seriados de 40 μm en criostato (Microm, Alemania) a -20°C . Con la ayuda de un microscopio estereoscópico (ZEISS, Alemania) se identificó el sitio de microinyección (Figura 9).

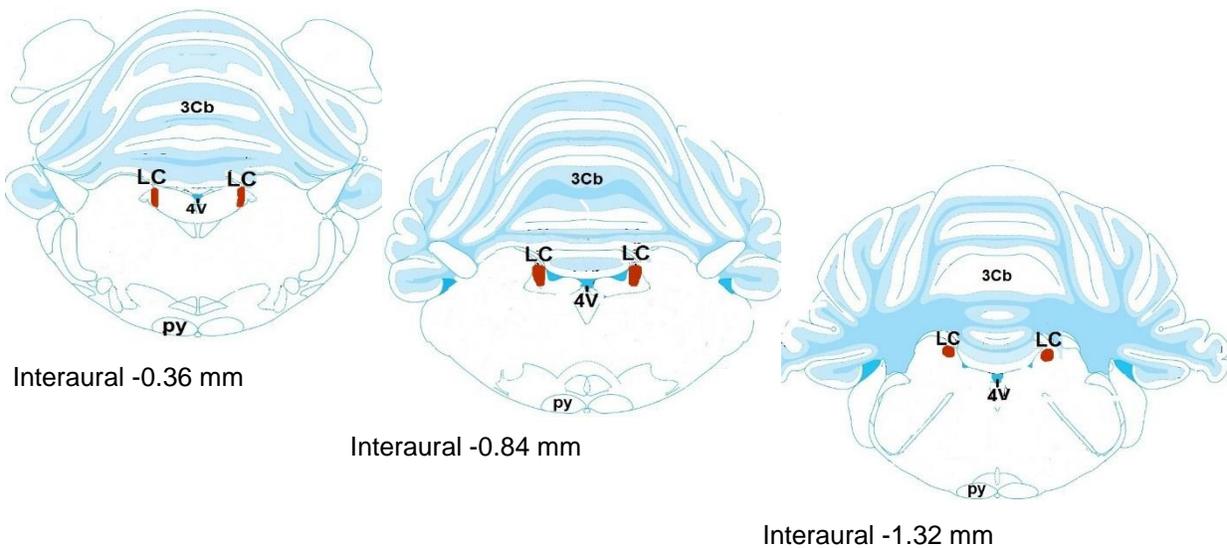


Figura 9. Diagrama de corte coronal del cerebro de la rata donde se muestra en sombreado de color rojo la totalidad del núcleo *locus coeruleus* (LC), cuarto ventrículo (4V), tercer lóbulo cerebelar (3Cb), tracto piramidal (py) (Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2007).

CUANTIFICACIÓN DE NORADRENALINA Y DEL ÁCIDO 3-METOXI-4-HIDROXIFENILGLICOL

Las muestras obtenidas del hipotálamo e hipófisis se pesaron en balanza analítica (AP250D, OHAUS, Suiza) y se colocaron por separado en tubos cónicos de 1.5 mL de solución de ácido perclórico al 0.1 M (J.T. Baker, México), para el hipotálamo se adicionaron 300 μL y 150 μL para la hipófisis. Las muestras se homogenizaron en frío y centrifugaron a 9600 rpm a -4°C durante 30 minutos. El sobrenadante de las muestras

de hipotálamo se filtró a través de una maya con poro 0.22 μm (Millipore Bedford, MA, USA) y 100 μL del extracto se inyectó al sistema de cromatografía para la muestra de hipófisis no se filtró.

SISTEMA DE CROMATOGRAFÍA DE LÍQUIDOS DE ALTA PRESIÓN

El equipo de HPLC consistió de una bomba isocrática (Bionalytical Systems, Inc, modelo PM-80, 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 μm de diámetro (Bionalytical Systems, Inc, USA) acoplada a un detector electroquímico (modelo L-4-C4, Bionalytical Systems Inc, USA) conformado por un electrodo de trabajo de carbono vidriado y un electrodo (MR - 5272 Bionalytical Systems, USA) 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 software ChromatoGraph versión 2.50.00 (Bionalytical Systems Inc, USA).

La fase móvil consistió en una disolución (pH 3) con 15.75 g de ácido cítrico (Merck, Alemania), 200 mg de ácido 1-Octanosulfónico sal sódica (Sigma-Aldrich, USA) y ajustado a pH 3. La solución se filtró a través de una membrana de celulosa con poro de 0.22 μm (Millipore Corporation, Japón) y degaseada al vacío. Se agregaron 10 mL de acetonitrilo (Omnisolve, EM Science, Canadá) y 15 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 (-)-noradrenalina ((-)-arterenol) y 4-hidroxi-3-metoxifenilglicol hemipiperazinio sal (Sigma-Aldrich, USA), preparadas, diluidas en ácido perclórico al 0.1 N y almacenadas a -70°C . El sistema fue calibrado con el método estándar externo empleando el área de los picos obtenidos 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 0.99. 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 y col., 1989):

$$\text{La actividad de la neurona} = \frac{[\text{MHPG}]}{[\text{NA}]}$$

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los resultados obtenidos de la edad de la apertura vaginal, la edad del primer estro y el número de ovocitos liberados fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida de la prueba de Dunn o por “U” de Mann-Whitney. El peso corporal, del útero y la masa ovárica fueron analizados por la prueba de varianza múltiple seguida de la prueba de Tukey. En aquellos resultados que se requirió comparar dos grupos se analizaron por la prueba de “t” de Student. La tasa de animales ovulantes se analizó por la prueba exacta de Fisher. En todos los casos se consideraron diferencias significativas cuando la probabilidad fue igual o menor al 5%.

RESULTADOS

En comparación con el grupo de animales testigo absoluto, la inyección del vehículo resultó en el adelanto de la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal (Cuadro 1), el día de la canalización vaginal el 80% de los animales presentaron células cornificadas en el frotis vaginal (característica de estro) y el 20% restante se observaron células nucleadas (proestro). El peso corporal, del útero y la masa ovárica fue similar (Cuadro 2).

En los animales anestesiados el día de la canalización vaginal el 20% de ellos presentaron células cornificadas en el frotis vaginal (característica de estro), el 50% células nucleadas y el 30% restante se observaron células nucleadas (proestro). El peso corporal fue mayor en comparación con el grupo de animales que se les inyectó vehículo. No se observaron modificaciones en los demás parámetros evaluados (Cuadro 1 y 2).

Cuadro 1. Tasa de animales ovulantes y la media \pm e.e.m. de la edad de la apertura (EAV), del primer estro vaginal (EPE) y del número de ovocitos liberados de ratas testigo absoluto (TA) o inyectadas por vía intraperitoneal con vehículo (Vh) o con anestesia (K+X) a los 20 días de edad y autopsiadas en el día del primer estro vaginal.

	TA	Vh	K+X
n	10	10	10
EAV (días)	39.0 \pm 0.9	35.4 \pm 0.9 *	37.0 \pm 1.3
EPE (días)	40.8 \pm 0.9	36.0 \pm 1.1 *	39.7 \pm 1.2
Número de ovocitos	7.1 \pm 1.4	6.3 \pm 1.0	7.8 \pm 1.2
TAO	7/10	6/10	9/10

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

Cuadro 2. Media \pm e.e.m. del peso corporal (PC), de la masa ovárica y del útero de ratas testigo absoluto (TA) o inyectadas por vía intraperitoneal con vehículo (Vh) o con anestesia (K+X) a los 20 días de edad y autopsiadas en el día del primer estro vaginal.

	TA	Vh	K+X
Peso corporal (g)	127.3 \pm 5.4	117.4 \pm 4.4	142.2 \pm 5.2 *
Masa ovárica (mg)	33.0 \pm 3.0	39.2 \pm 0.7	45.1 \pm 2.9
Peso de útero (mg)	171.6 \pm 12.9	161.3 \pm 5.9	189.5 \pm 16.7

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

En comparación con los grupos de animales anestesiados, en los animales con operación simulada (microinyección de vehículo en el núcleo LC izquierdo o derecho) no se observaron diferencias significativas en la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal, el número de ovocitos liberados, la tasa de animales ovulantes (Cuadro 3), el peso corporal, del útero y de la masa ovárica (Cuadro 4). En los animales con OS derecha el día de la canalización el 66% de ellos presentaron en el frotis vaginal células escamadas, el 11% células nucleadas y el 22% restante leucocitos. Mientras que en los animales con OS izquierda el 30% presentaron estro en el frotis vaginal, el 20% proestro y el 50% restante diestro.

Cuadro 3. Tasa de animales ovulantes y la media \pm e.e.m. de la edad de la apertura (EAV), del primer estro vaginal (EPE) y del número de ovocitos liberados de ratas con anestesia (K+X) o con operación simulada del núcleo del *locus coeruleus* izquierdo (OSI) o derecho (OSD) a los 20 días de edad y autopsiadas en el día del primer estro vaginal.

	K+X	OSI	OSD
n	10	10	9
EAV (días)	37.0 \pm 1.3	40.7 \pm 0.8	40.7 \pm 1.2
EPE (días)	39.7 \pm 1.2	44.0 \pm 1.0	41.5 \pm 1.2
Número de ovocitos	7.8 \pm 1.2	6.7 \pm 0.7	5.2 \pm 1.0
TAO	9/10	8/10	8/9

Cuadro 4. Media \pm e.e.m. del peso corporal (PC), de la masa ovárica y del útero de ratas anestesia (K+X) o con operación simulada del núcleo del *locus coeruleus* izquierdo (OSI) o derecho (OSD) a los 20 días de edad y autopsiadas en el día del primer estro vaginal.

	K+X	OSI	OSD
Peso corporal (g)	142.2 \pm 5.2	131.2 \pm 5.1	120.6 \pm 3.6
Masa ovárica (mg)	45.1 \pm 2.9	47.5 \pm 4.3	41.5 \pm 2.2
Peso de útero (mg)	189.5 \pm 16.7	194.7 \pm 15.5	171.4 \pm 9.9

En el hipotálamo anterior, medio y posterior medio de los animales con operación simulada izquierda o derecha se observó una mayor concentración de MHPG y la relación [MHPG/NA] en comparación con el grupo de anestesia (Cuadro 5).

En comparación con el grupo de animales con inyección de vehículo, la concentración de NA no se modificó, mientras que MHPG se encontró por debajo de la sensibilidad del método en los animales con anestesia (cuadro 5).

En comparación con el grupo de animales con anestesia, la concentración de NA y MHPG fue mayor a la sensibilidad del método en los animales con operación simulada izquierda (Cuadro 5).

Cuadro 5. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido), de noradrenalina (NA), ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y de la actividad de la neurona noradrenérgica [MHPG/NA] en el hipotálamo anterior, medio y posterior de ratas tratadas con vehículo (Vh), anestesia (K+X) o con operación simulada izquierda (OSI) o derecha (OSD) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	NA	MHPG	[MHPG/NA]
Hipotálamo Anterior			
Vh	1.63 \pm 0.15	< 0.0001	--
K+X	1.55 \pm 0.27	< 0.0001	--
OSI	1.39 \pm 0.07	0.59 \pm 0.18	0.34 \pm 0.14
OSD	1.53 \pm 0.17	0.37 \pm 0.15	0.33 \pm 0.19
Hipotálamo Medio			
Vh	1.33 \pm 0.15	< 0.0001	--
K+X	1.54 \pm 0.33	< 0.0001	--
OSI	1.61 \pm 0.22	0.57 \pm 0.14	0.50 \pm 0.36
OSD	1.38 \pm 0.28	1.08 \pm 0.59	0.83 \pm 0.33
Hipotálamo Posterior			
Vh	1.00 \pm 0.72	0.36 \pm 0.27	--
K+X	0.50 \pm 0.36	< 0.0001	--
OSI	0.63 \pm 0.13	1.13 \pm 0.52	0.32 \pm 0.16
OSD	0.53 \pm 0.20	0.40 \pm 0.21	1.00 \pm 0.70

< concentración por debajo de la sensibilidad del método (0.0001ng).

Cuadro 6. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA), ácido 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en la hipófisis de ratas tratadas con vehículo (Vh), anestesia (K+X) o con operación simulada izquierda (OSI) o derecha (OSD) y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

GRUPO	NA	MHPG
Vh	< 0.0001	0.06 \pm 0.04
K+X	< 0.0001	< 0.0001
OS-I	0.06 \pm 0.02	1.03 \pm 0.17
OS-D	< 0.0001	< 0.0001

< concentración menor a la sensibilidad del método (0.0001 ng).

En la figura 10 se muestra el área de lesión del LC de los animales que recibieron donde se observó que la lesión comprendía la totalidad del núcleo izquierdo o derecho. Solo aquellos animales con lesiones completas del LC fueron incluido en el análisis.

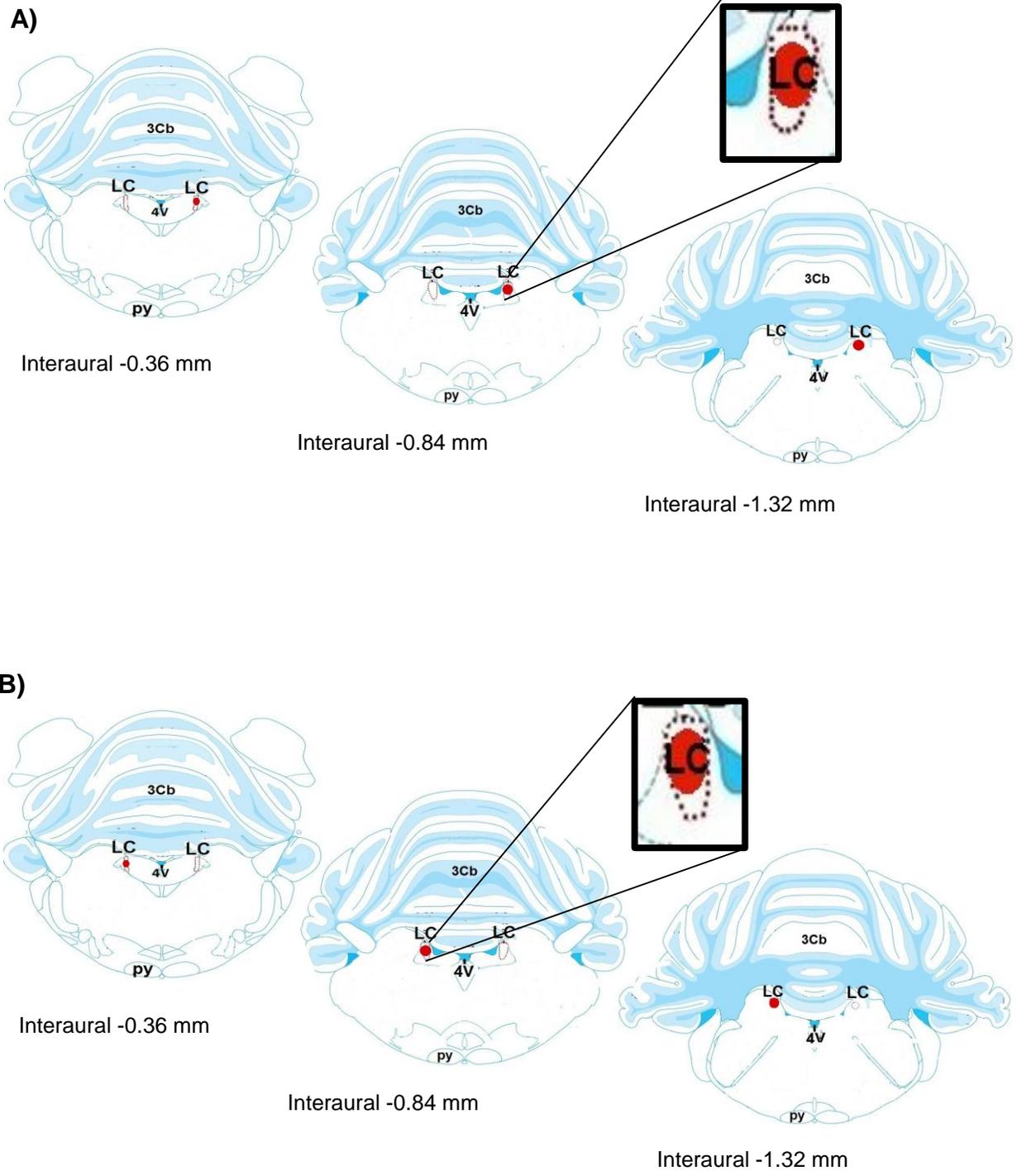


Figura 10. Diagrama de corte coronal del cerebro de la rata, en el que representa esquemáticamente la lesión completa del núcleo LC. El área sombreada en color rojo representa la extensión del área de lesión inducida por 10 o 75 μ g de N-2-cloroetil-N-2-bromobenzilamina. A) Lesión del núcleo derecho B) Lesión del núcleo izquierdo. Locus coeruleus (LC), cuarto ventrículo (4V), tercer lóbulo cerebelar (3Cb), tracto piramidal (py) (Tomada y modificada de Paxinos y Watson, 2007).

No se observaron diferencias significativas en la edad de la apertura y del primer estro vaginal, el número de ovocitos liberados (Cuadro 7), del peso corporal y de la masa ovárica (Cuadro 8). En comparación con el grupo de animales con lesión completa izquierda inducida con 10 µg, se observó que el peso del útero fue mayor en comparación con su respectivo grupo de lesión completa con 75 µg (Cuadro 8). En el día de la canalización vaginal se observó que el 40% y el 36% de los animales lesionados con 10 o 75 µg de DSP₄ respectivamente, presentaron en el frotis vaginal células en escama, 40% y 9% células nucleadas y el 20% y 55% restante leucocitos.

Cuadro 7. Tasa de animales ovulantes y la media ± e.e.m. de la edad de la apertura (EAV), del primer estro vaginal (EPE) y del número de ovocitos liberados de ratas con operación simulada (OSI) o con lesión completa izquierda (LCI) inducida por la microinyección de 10 o 75 µg / 0.5 µL de DSP₄ a los 20 días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	OSI	LCI	
		10 µg	75 µg
n	10	10	11
EAV	40.7 ± 0.8	39.1 ± 1.4	37.7 ± 0.4
EPE	44.0 ± 1.0	41.7 ± 1.2	47.7 ± 1.0
Número de ovocitos	6.7 ± 0.7	7.4 ± 0.8	7.4 ± 1.1
TAO	8/10	7/10	9/11

Cuadro 8. Media \pm e.e.m. del peso corporal (PC), de la masa ovárica, de las adrenales y del útero de ratas con operación simulada (OSI) o con lesión completa izquierda (LCI) inducida por la microinyección de 10 o 75 μ g / 0.5 μ L de DSP₄ a los 20 días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	OSI	10 μ g	75 μ g
			LCI
Peso corporal (g)	131.2 \pm 5.1	122.4 \pm 5.5	128.4 \pm 5.9
Masa ovárica (mg)	47.5 \pm 4.3	42.8 \pm 3.6	43.1 \pm 4.2
Peso del útero (mg)	194.7 \pm 15.5	161.8 \pm 7.4	204.1 \pm 14.4 #

$p < 0.05$ vs. grupo LCI 10 μ g (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).

En los animales con lesión completa derecha, independientemente de la dosis de DSP₄ se observó disminución de la tasa de animales ovulantes en relación con el grupo de operación simulada, sin modificarse la edad de la apertura vaginal, del primer estro vaginal, ovocitos liberados (Cuadro 9), el peso corporal, del útero y de la masa ovárica (datos no mostrado). En el día de la canalización vaginal se observó que el 30% y el 40% de los animales lesionados con 10 o 75 μ g de DSP₄ respectivamente, presentaron en el frotis vaginal células en escama, 40% y 14% células nucleadas y el 30% y 43% restante leucocitos.

En el hipotálamo anterior de animales con lesión completa izquierda inyectados con 75 μ g de DSP₄ se observó una mayor concentración de NA, en comparación con su respectivo grupo con operación simulada. Mientras que MHPGH fue menor en comparación con el grupo lesión completa (10 μ g) (Gráfica 1).

En el hipotálamo anterior y medio de los animales con lesión completa derecha inducida por la microinyección de 75 μ g de DSP₄ la concentración de MHPG fue menor a la sensibilidad del método (< 0.0001 ng) (Gráfica 1 y 2).

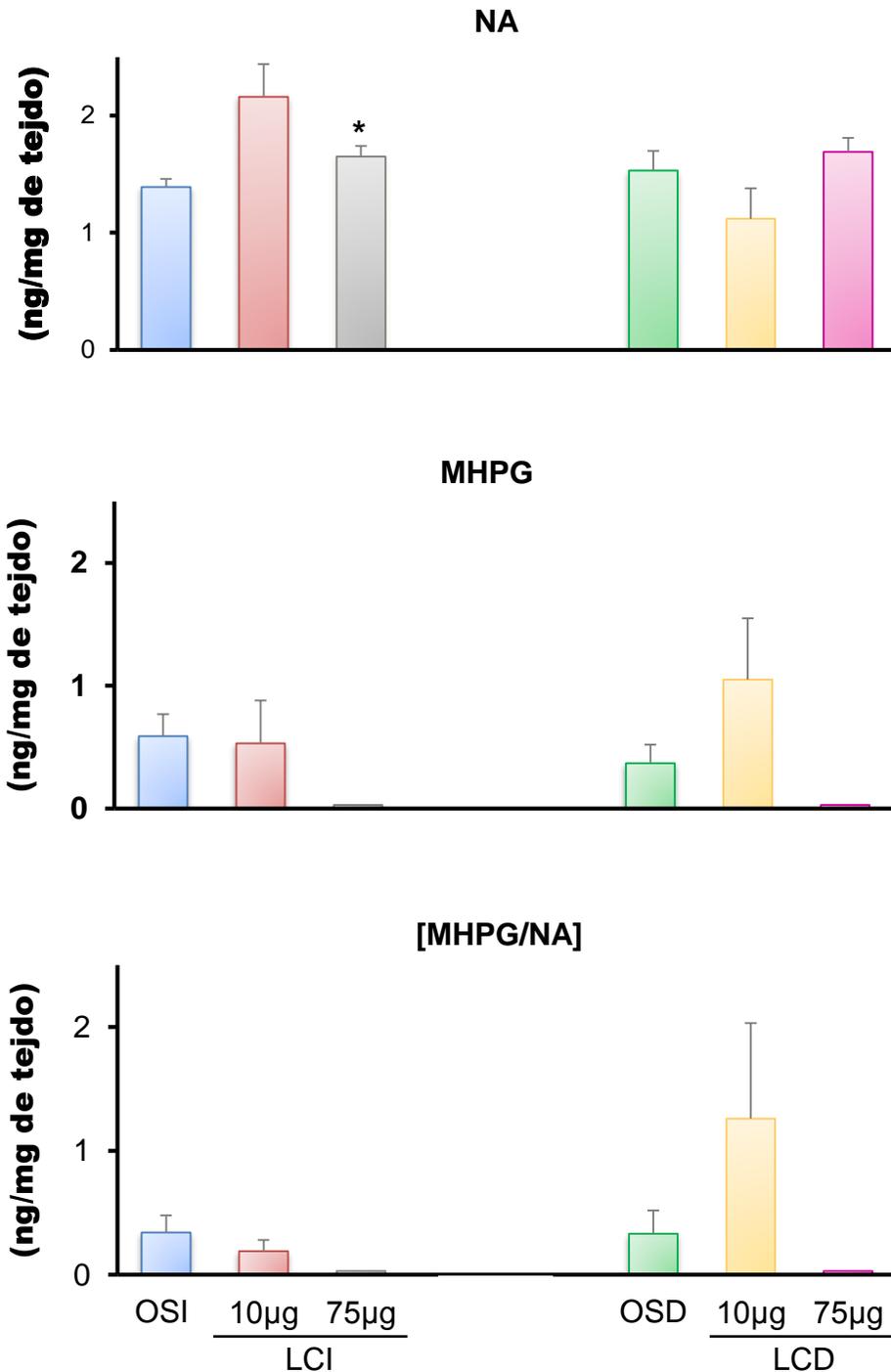
Cuadro 9. Tasa de animales ovulantes y la media \pm e.e.m. de la edad de la apertura (EAV), del primer estro vaginal (EPE) y del número de ovocitos liberados de ratas con operación simulada (OSD) o con lesión completa derecha (LCD) inducida por la microinyección de 10 o 75 μg / 0.5 μL de DSP₄ a los 20 días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

	OSD	10 μg	75 μg
	LCD		
n	9	10	7
EAV (días)	40.7 \pm 1.2	38.5 \pm 0.8	38.4 \pm 0.6
EPE (días)	41.5 \pm 1.2	41.1 \pm 0.9	40.7 \pm 1.3
Número de ovocitos	5.2 \pm 1.0	7.0 \pm 1.0	3.3 \pm 1.4
TAO	8/9	7/10	3/7 *

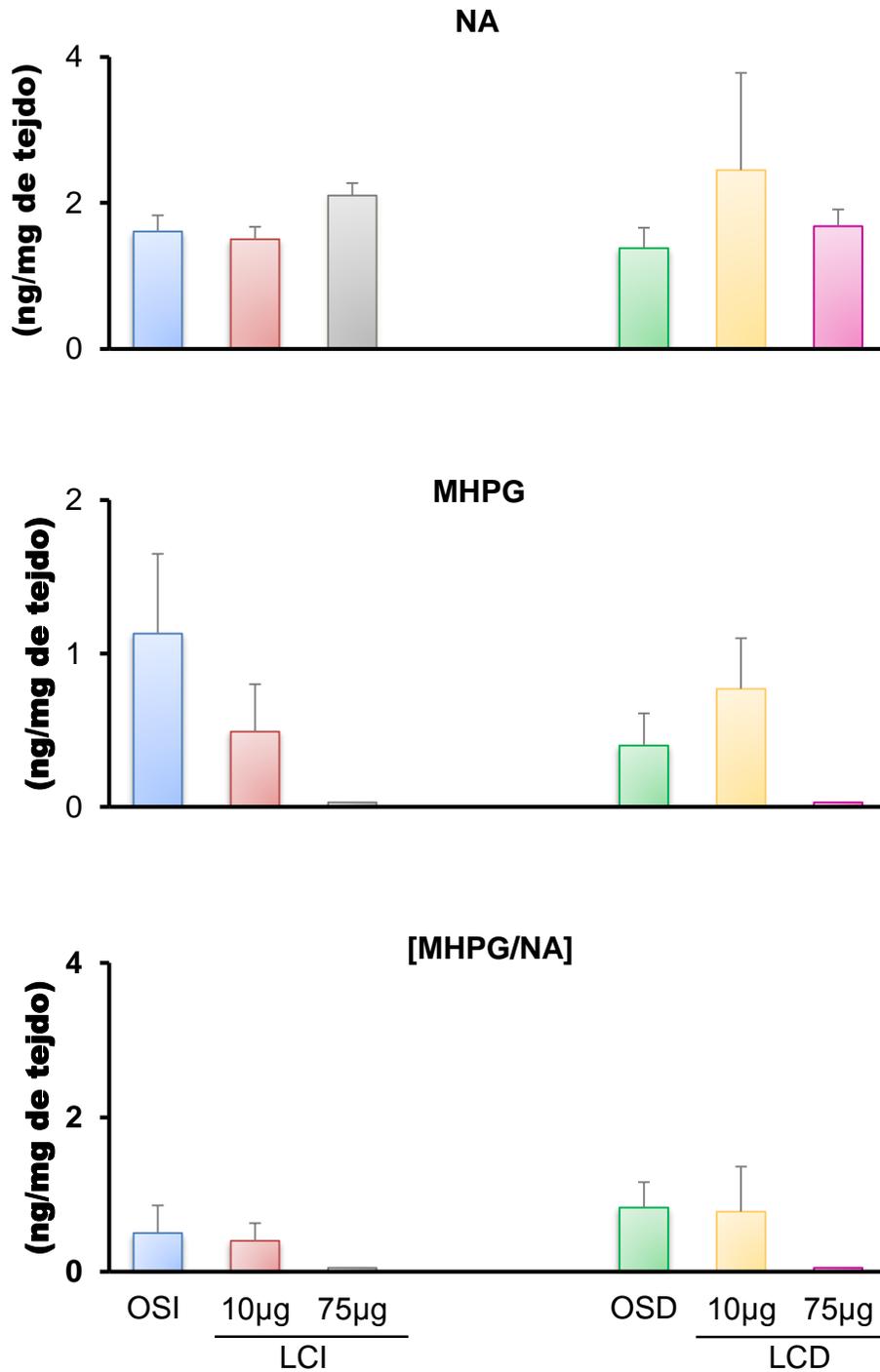
* $p < 0.05$ vs. grupo OSD (Prueba de Fisher).

En el hipotálamo medio de los animales con lesión completa izquierda inyectados con 75 μg la concentración de MHPG fue menor a la sensibilidad del método. Mientras que NA fue similar en los animales con lesión independientemente de la dosis con respecto a su grupo de operación simulada (Gráfica 2).

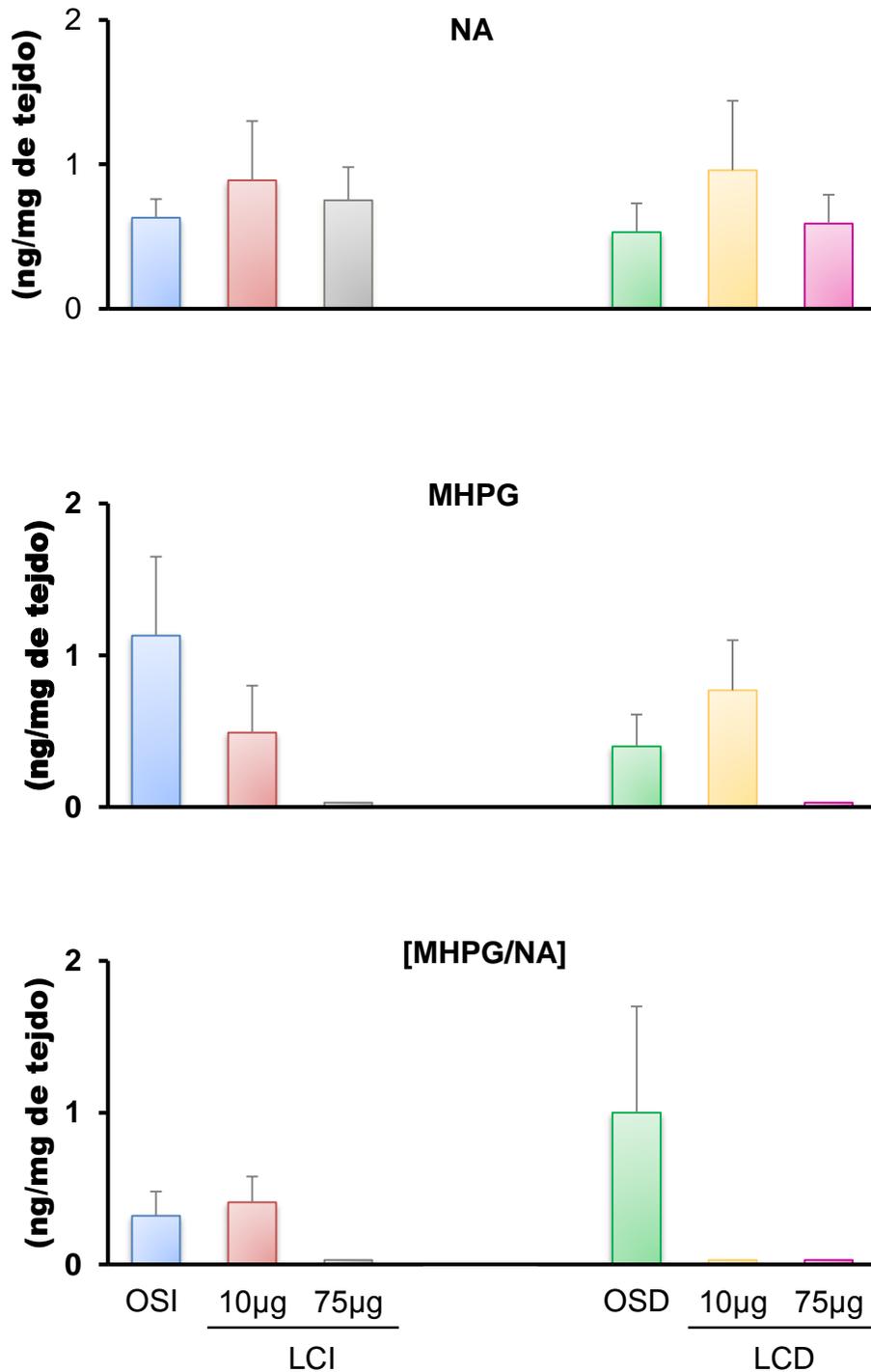
En comparación con el grupo con operación simulada, la concentración de MHPG en el hipotálamo posterior fue menor a la sensibilidad del método en los animales con lesión completa izquierda y derecha con 75 μg (Gráfica 3).



Gráfica 1. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y la relación entre [MHPG/NA] en el hipotálamo anterior de ratas con operación simulada izquierda (OSI) o derecha (OSD) o con lesión completa izquierda (LCI) o derecha (LCD) inducida por la microinyección de 10 o 75 μ g / 0.5 μ L de DSP₄ a los 20 días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal. * $p < 0.05$ vs. grupo OSI (Prueba de ANDEVA seguida de la prueba de Tukey).



Gráfica 2. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y la relación entre [MHPG/NA] en el hipotálamo medio de ratas con operación simulada izquierda (OSI) o derecha (OSD) o con lesión completa izquierda (LCI) o derecha (LCD) inducida por la microinyección de 10 o 75 μ g / 0.5 μ L de DSP₄ a los 20 días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.



Gráfica 3. Media \pm e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) y la relación entre [MHPG/NA] en el hipotálamo posterior de ratas con operación simulada izquierda (OSI) o derecha (OSD) o con lesión completa izquierda (LCI) o derecha (LCD) inducida por la microinyección de 10 o 75 μ g / 0.5 μ L de DSP₄ a los 20 días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

En comparación con el grupo de animales con operación simulada en la hipófisis de los animales con lesión completa del *locus coeruleus* izquierdo independientemente de la dosis la concentración de NA y MHPG fue menor a la sensibilidad del método (Gráfica 4).

La concentración de NA y su metabolito en la hipófisis fue menor a la sensibilidad del método en los animales con operación simulada derecha o con microinyección de DSP₄ en LC, independientemente de la dosis de 10 o 75 µg de DSP₄ (Cuadro 10).

Cuadro 10. Media ± e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de noradrenalina (NA) y de 3-metoxi-4-hidroxifenilglicol (MHPG) en la hipófisis de ratas con operación simulada izquierda (OSI) o derecha (OSD) o con lesión completa izquierda (LCI) o derecha (LCD) inducida por la microinyección de 10 o 75 µg / 0.5 µL de DSP₄ a los 20 días de edad y sacrificadas en el día del primer estro vaginal.

GRUPO		NA	MHPG
	OS-I	0.06 ± 0.02	1.03 ± 0.17
10 µg	LC-I	< 0.0001	< 0.0001
75 µg	LC-I	< 0.0001	< 0.0001
	OS-D	< 0.0001	< 0.0001
10 µg	LC-D	< 0.0001	< 0.0001
75 µg	LC-D	< 0.0001	< 0.0001

< 0.0001: por debajo de la sensibilidad del método.

DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en este estudio nos llevan a pensar que en el animal de 20 días de edad el sistema noradrenérgico que se origina en el núcleo *locus coeruleus* izquierdo no participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad, mientras que el núcleo derecho ejerce un efecto estimulante sobre la regulación de la respuesta ovulatoria. El hecho de que no se modificó la edad de la apertura y del primer estro vaginal y la ovulación en los animales con lesión izquierda, así como la menor tasa de animales ovulantes en el grupo con lesión derecha apoyan esta idea.

El adelanto de la edad de la apertura vaginal y del primer estro observado en los animales inyectados con vehículo por vía intraperitoneal, posiblemente es resultado del adelanto de la secreción preovulatoria de hormonas esteroides inducido por estrés de la inyección peritoneal. Las hormonas gonadales son factores que producen hinchazón, hiperemia y reabsorción de la membrana que recubre la vagina (Vázquez, 2018). En la rata se ha mostrado que en algunas condiciones de estrés resulta en una mayor secreción de la hormona adrenocorticotropica (ACTH por sus siglas en inglés), glucocorticoides (Arcana y Navasivayam, 1999; Van Raaij y col., 1997) y hormonas esteroides (McEwen, 2000; Tilbrook y col., 2000). La ACTH produce un aumento intracelular de adenosinmonofosfato cíclico (AMPC) que activa a la enzima adenilato ciclasa y a la P450 scc, que cataliza la conversión de colesterol a pregnenolona e inicia la síntesis de esteroides (Vázquez, 2018).

Los estrógenos estimulan el crecimiento de las células del útero que toman la apariencia cornificada, las cuales posteriormente pierden su núcleo y hay mayor secreción en días cercanos a la pubertad (Steinetz, BC., 1978; Hisano, 1977; Ojeda y Skinner, 2006). Por lo que es posible que al inyectar el vehículo se activó el eje hipotálamo-hipófisis-adrenal lo que resultó en el adelantó de la secreción preovulatoria de estrógenos y por ende la presencia del estro vaginal. El hecho de que el 80% de los animales inyectados con vehículo por vía intraperitoneal presentaron un estro vaginal el día que se presentó la canalización vaginal apoya esta interpretación.

El hecho de que en los animales con lesión del LC no se modificó la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal, nos lleva a sugerir que el sistema noradrenérgico que se origina en núcleo en el animal de 20 días no participa en los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad. Sin embargo, estos resultados no concuerdan con lo reportado por Rayón (2014) quien mostró que en el animal juvenil de 30 días la lesión química unilateral del LC retrasa el inicio de la pubertad y disminuye la ovulación. Una explicación a estas diferencias es que a lo largo del desarrollo prepuberal de la rata el sistema noradrenérgico que se origina en el LC participa de manera diferencial en los mecanismos neuroendocrino que regulan el inicio pubertad, a los 30 días sería estimulante y a los 20 días de edad no participa.

Glitler y Barraclough (1987), mostraron que en la rata hembra adulta la estimulación eléctrica del LC potencializa la secreción de LH solo después de la despolarización preliminar de las neuronas GnRHérgicas por el estímulo eléctrico del área preóptica medial (MPOA), mientras que la lesión electrolítica bloquea la secreción preovulatoria de LH y el aumento de la secreción de LH después de la ovariectomía (Anselmo-Franci y col., 1997, 1999). Dichos resultados son un indicador de que la integridad de las aferencias nerviosas del LC es esencial en la regulación de la secreción preovulatoria de las gonadotropinas. El hecho de que únicamente el 43% de los animales con lesión derecha con 75 µg de DSP₄ presentó ovulación, y su cuenta ovulatoria fue ligeramente menor, puede ser resultado de la disminución de la secreción de las gonadotropinas, inducida por una baja actividad de la neurona noradrenérgica en el *locus coeruleus*. Es posible que al disminuir la información noradrenérgica que llega al hipotálamo, la secreción de FSH y LH sea insuficiente para el mantener el desarrollo de los folículos y que culminaran con la ovulación. La FSH estimula el crecimiento y proliferación de los folículos ováricos (Erickson y Shimasaki, 2001; Hunzicker-Dunn y Mayo, 2006) y la LH estimula la maduración final del ovocito, la ruptura del folículo y como consecuencia de la liberación del ovocito (ovulación) y la formación del cuerpo lúteo (Hunzicker-Dunn y Mayo, 2006; Prieto y Velázquez, 2002). En conjunto estos resultados nos permiten sugerir que la lesión del LC derecho modificó la secreción de GnRH y como consecuencia

de FSH y LH y que al modificar la vía neural de comunicación entre el LC y el hipotálamo un menor número de folículos alcanzaran la etapa preovulatoria.

En el hipotálamo de los animales con lesión no se observó modificación en la concentración de NA, no concuerda con la información que esta benzilamina es un fármaco que daña selectivamente a las neuronas noradrenérgicas al formar iones aziridium que daña a las proteínas de la membrana de la mitocondrial y al ADN (Szot y col., 2010). Una posible explicación a esta diferencia es que al disminuir el aporte de NA inducido por la microinyección unilateral de DSP₄ en el LC se incrementó la NA que proviene del núcleo remanente o de los otros centros noradrenérgicos que inervan al hipotálamo. Se ha mostrado que el área preóptica recibe inervación de A1 y A2 (Clark y col., 1999) y el hipotálamo lateral es inervado por A7 (Holden y col., 2018).

Otra posible explicación a que la concentración de NA fuera normal en los animales con lesión es que en el núcleo LC exista selectividad entre de las neuronas noradrenérgicas a la acción de la bromobenzilamina como lo han propuesto algunos autores (Jaim-Etcheverry y Zieher, 1980; Jonsson y col., 1981; Archer y col., 1984; Fritschy y Grzanna 1989, Zhang y col., 1995; Ross y Stenfors, 2015). Zhang y colaboradores (1995) mostró que en el macho adulto la administración sistémica de 50 mg/kg de DSP₄ disminuye el número de neuronas y fibras inmunoreactivas a DBH en la región posterior de LC y no modifica la parte anterior del núcleo. Sin embargo, hasta el momento no es claro el mecanismo de neurotoxicidad.

El incremento de la concentración de NA en el hipotálamo anterior de los animales con lesión de LC izquierdo no concuerda con lo descrito por otros autores. Acevedo (2017) afirma que, en la rata hembra de 20 días de edad, la inyección intraperitoneal del DSP₄ no modifica la concentración de NA. Una posible explicación de dicha diferencia es que es posible que exista un mayor aporte del neurotransmisor por las neuronas de la región A2 que llegan a la región del hipotálamo (Dahlström y Fuxe 1965) en respuesta a la disminución de la información noradrenérgica inducida por lesión del LC.

El hecho de que en la hipófisis de los animales tratados con 75 µg de DSP₄ la concentración de MHPG esté por debajo de la sensibilidad del método y disminuyera la actividad de la neurona noradrenérgica concuerdan con los resultados obtenidos por Rayón (2014) quien observó que en la rata hembra de 30 días la lesión química unilateral de LC disminuye la concentración de NA en la glándula. En conjuntos estos resultados nos permiten suponer que existe una relación neural entre el LC y la glándula. Sin embargo, hasta el momento no existe información anatómica que apoyen esta idea, pero es posible pensar que al microinyectar el neurotóxico en el LC disminuyó el aporte de NA a la hipófisis. Bicknell y colaboradores, (1988) proponen que en la rata macho adulto la hipófisis posterior recibe inervación de la región A2.

El hecho de que la concentración de MHPG en el hipotálamo e hipófisis de los animales tratados con 75 µg de DSP₄ en el LC fue menor a la sensibilidad del método (>0.0001 ng) es resultado del daño de las neuronas noradrenérgicas por acción de la bromobenzilamina al formar iones aziridinium, ion altamente reactivo que daña a las proteínas de la membrana mitocondrial, al ADN e inhibe la fosforilación oxidativa de ATP lo que conduce a la muerte de la célula (Ross y col, 2015). Szot y colaboradores, (2010) mostró que en el macho adulto la administración sistémica de DSP₄ disminuye la concentración de uno de los metabolitos de NA, el 3,4-dihidroxiifenilglicol en el hipotálamo, cerebelo y LC. En conjuntos estos resultados nos llevan a pensar que existe una alteración en el metabolismo de MHPG, ya que DSP₄ es un inhibidor de MAO en el hígado de rata (Lyles y Callingham, 1981).

La menor la concentración de MHPG en el hipotálamo e hipófisis de los animales tratados con la mayor dosis de DSP₄ con respecto al grupo de animales que recibió 10 µg, es resultado de una acción dosis-dependiente del fármaco sobre el metabolismo de NA, idea planteada por otros autores. Harro y colaboradores, (1999) mostraron que en el hipocampo de la rata macho adulto sacrificado 10 días posteriores a la inyección intraperitoneal de 5 mg/Kg de DSP₄ la concentración de NA resultó en una reducción del 35%, mientras que en dosis de 10 ó 30 mg/Kg fue mayor (60% y 95% respectivamente).

El mayor peso corporal observado los animales inyectados con ketamina-xilacina no podría ser resultado del aumento de la secreción de la hormona de crecimiento (GH) inducido por la anestesia. La ketamina es un anestésico disociativo antagonista no selectivo de los receptores a glutamato del tipo N-metil-D-aspartato (Cuevas y col., 2013). En toros (Shahab y col, 1993), cerdos (Estienne y col., 1998; Estienne y col., 2002) y caballos (Sticker y col., 2001) se ha mostrado que la activación de los receptores a glutamato del tipo NMDA resulta en el incremento de la concentración sérica de GH. Sin embargo, hasta el momento no podemos adelantar una explicación sobre este evento.

El mayor peso del útero de los animales con lesión completa inducida por la inyección de 75 µg de DSP₄, puede ser resultado de la modificación en la secreción de estrógenos; el hecho que en éstos animales presentaron un ligero adelanto de la edad de la apertura vaginal y del primer estro apoyan esta idea. Los estrógenos incrementan la permeabilidad, la proliferación de células de la pared, lo que se refleja en el peso del útero (Merlo y col., 2003; Tchernitchin y Tchernitchin, 1976).

A diferencia de lo que ocurre con la lesión del LCI, la microinyección de DSP₄ en el LC derecho la disminuyó la respuesta ovulatoria (proporción de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados). Esto permite sugerir que las diferencias en la respuesta ovulatoria entre los animales con lesión derecha e izquierda es resultado de él sistema noradrenérgico que se origina en cada núcleo y que llegan al hipotálamo participan de manera diferencial en los mecanismos que regulan la ovulación. Dicha idea ha sido propuesta para otros sistemas de neurotransmisión que modulan la secreción de las gonadotropinas como el colinérgico (González, 2017; López y col., 2017).

En suma los resultados obtenidos en este estudio, nos permiten proponer que la rata de 20 días de edad (etapa infantil tardía) el sistema noradrenérgico que se origina en el núcleo *locus coeruleus* no participa en los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad.

CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos en el presente estudio proponemos que en la rata de 20 días de edad (etapa infantil tardía):

- El sistema noradrenérgico que se origina en el núcleo *locus coeruleus* no participa en la modulación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan la apertura vaginal.
- La información noradrenérgica que se origina en el núcleo *locus coeruleus* izquierdo no participa en la modulación de los mecanismos neuroendocrinos que regulan el inicio de la pubertad y la primera ovulación.
- El sistema noradrenérgico que se origina en el núcleo *locus coeruleus* derecho estimula los mecanismos que regulan la respuesta ovulatoria.
- La lesión de las neuronas noradrenérgicas del *locus coeruleus* afecta de manera diferencial el aporte de noradrenalina al hipotálamo.
- Es posible que exista una comunicación neural de tipo noradrenérgico entre el núcleo *locus coeruleus* y la hipófisis.

REFERENCIAS

- Acevedo, L. (2017). La inhibición del sistema noradrenérgico modifica las funciones del ovario en la rata prepúber. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- Adams, LP. y Steiner, RA. (1988). Puberty. *Reproductive Biology*. 10:152.
- Ahmed, C., Dees, W. y Ojeda, S. (1986). The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*. 118: 1682-1689.
- Alm P., Alumets J., Hakanson R., Owman O., Sjöberg N., Sundler F. y Walles B. (1980). Origin and distribution of VIP (Vasoactive Intestinal Polypeptide- nerves in the genito-urinary tract. *Cell and Tissue Research*. 205 (3): 337-347.
- Anselmo-Franci, JA., Franci, CR., Krulich, L., Antunes-Rodrigues, J. y McCann, SM. (1997). Locus Coeruleus lesions decrease norepinephrine input into the medial preoptic area and medial basal hypothalamus and block the LH, FSH and prolactin preovulatory surge. *Neuroendocrinology*. 41:44-51.
- Arata de Bellabarba, G., Bishop, A. y Rojas, FJ. (1981). Inicio de la pubertad en la rata hembra. *Acta Científica Venezolana*. 32:457-462.
- Araya, V. (2013). Trastornos de la glándula suprarrenal: Diagnóstico y tratamiento. *Revista de Medicina Clínica*. 24(5):768-777.
- Arcana, R. y Navasivayam, A. (1999). The effect of acute noise stress on neutrophil functions. *Indian Journal Physiology Pharmacology*. 43:491-495.
- Archer, T., Jonsson, G. y Ross, SB. (1984). A parametric study of the effects of the noradrenaline neurotoxin DSP₄ on avoidance acquisition and noradrenaline neurones in the CNS of the rat. *Brain Journal Pharmacology*. 82:249-257.
- Baron, G. (2019). Fundamentos de endocrinología ginecológica. Ovulación. Recuperado de:
<https://encolombia.com/libreria-digital/medicina/endocrino/fundamentos-endocrino-gine-capitulo3-2/>
- Becú, D. y Lacaú, I. (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiologica et Pharmacologica Latinoamericana*. 40:1-17.

- Bernuci, MP., Szawka, RE., Helena, CV., Leite, CM., Lara, HE. y Anselmo-Franci, JA. (2008). Locus Coeruleus Mediate Cold Stress-Induced Polycystic Ovary in Rats. *Endocrinology* 149 (6): 2907-2916.
- Bicknell, RK., Dyball, RE., Garten, LL., Heavens, P., Sirinathsinghji, DJS. y Zhao, BG. (1988). Evidence for a direct noradrenergic projection from the brain stem to the neural lobe in the rat. *Journal Physiology*. 396: 127.
- Botella, J. Fernández, A. (2007). La evolución de la sexualidad y los estados intersexuales. Ediciones Díaz de Santos. Madrid, España. Pág. 53-55.
- Bousfield, GR. (2006). Gonadotropins: Chemistry and Biosynthesis. En: *The Physiology of Reproduction*. Edits. E. Knobil, JD. Neil. Raven Press. San Diego. Pág. 1581-1634.
- Boyar, RM. (1978). Control of the onset of puberty. *Annual Review of Medicine*. 29: 509-520.
- Brandan, NC., Llanos, IC., Rodríguez, AN. y Ruiz, DA. (2010). Hormonas Catecolaminérgicas Adrenales. Facultad de Medicina. Universidad Nacional del Nordeste. Pág. 1-10.
- Brown, RE. (1999). Steroid hormones, Overview. En: *The Physiology of Reproduction*. Edits. E. Knobil, JD. Neil. Raven Press. EUA. 4:634-644.
- Cabrero, L., Saldívar, D. y Cabrillo, E. (2007). Obstetricia y medicina materno-fetal. Editorial Médica Panamericana. Madrid. Pág. 103.
- Calzada, R., Ruiz, M. y Altamirano, N. (2001). Características sexuales secundarias. *Acta Pediátrica de México*. 22(2): 122-127.
- Carlson, MD. y Bruce, M. (2014). Embriología Humana y Biología del Desarrollo. 5ª edición. Elsevier. Barcelona, España. 1-15.
- Clark, DL., Boutros, NN. y Méndez, MF.; Trad. Por Nuñez, J. (2012). El cerebro y la conducta: neuroanatomía para psicólogos. 2ª edición. Editorial El Manual Moderno México. Pág. 168.
- Clark, JI., Scott, CJ., y Rawson, J. (1999). Leveles of dopamine β hydroxylase immunoreactivity in the preoptic hypothalamus of the ovariectomised ewefollowing injection of oestrogen: Evidence for increased noradrenaline release around the time

of the oestrogen-induced surge in luteinizing hormone. *Journal of Neuroendocrinology*. 11: 503-512.

- Cuevas, E., Trickler, WJ., Guo, X., Ali, SF., Paule, MG. y Kanungo, J. (2013). Acetil L-carnitine protects motor neurons and Rohon-Beard sensory neurons agonist ketamine-induced neurotoxicity in zebrafish embryos. *Neurotoxicology and Teratology*. 39: 69-76.
- Curtis, H., Barnes, NS., Schnek, A. y Massarini, A. (2008). Biología. 7ª edición. Medica Panamericana. Buenos Aires. Pág. 782.
- Dahlström, A. y Fuxe, K. (1965). Evidence for the existence of monoamine neurons in the central nervous system. *Acta Physiologica Scandinavica*. 247(64):185.
- Döhler, KD. y Wuttke, W. (1975). Time course of serum gonadotropin, prolactin and gonadal steroids in prepuberal male and female rats. *Endocrinology*. 97:898-907.
- Domínguez R., Chávez R. y Cruz E. (1991). Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción. Miguel Ángel Porrúa. México. Pág. 161-192.
- Dos Santos, P. y Fabiana, G. (1995). Cambios neuroquímicos plásticos de larga duración en el sistema noradrenérgico central de la rata en respuesta al estrés. (Tesis de maestría). Universidad de la República, Uruguay.
- Dotti, C., y Taleisnik, S. (1982). Inhibition of the release of LH and ovulation by activation of the noradrenergic system. Effect of interrupting the ascending pathways. *Brain Research*. 249(2): 281-290.
- Erickson, GF., Shimasaki, S. (2001). Physiology of folliculogenesis: the role of the oocyte. *Fertility and Sterility*. 76: 943-949.
- Estienne, MJ. y Barb, CR. (2002). Modulation of growth hormone, luteinizing hormone, and testosterone secretion by excitatory amino acids in boars. *Reproductive Biology*. 2(1): 13-24.
- Estienne, MJ. y Hartsock, TG. (1998). Effect of exogenous gonadotropins on the weaning-to-estrus interval in sows. *Theriogenology*. 49(4): 823-828.
- Fawcett, D. y Bloom, W. (2003). Tratado de Histología. 3ª edición. McGraw-Interamericana, España, Pág. 280-286.
- Fernandez, D. y Mangel, T. (1983). Esteroidogénesis. *Acta Médica Costarricense*. 26(3): 144-149.

- Fink, G. (1988). Gonadotrophin secretion and its control. En: *The Physiology of Reproduction*. Edits. E. Knobil, JD. Neil. Raven Press. EUA. Pág. 1349-1378.
- Fortoul, T. y Castell, A. (2010). *Histología y biología celular*. 2ª edición. McGraw-Hill Interamericana. México.
- Freeman ME. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction*. Edits. E. Knobil, JD. Neil. 3a edición. Raven Press. Pág. 2327-2330.
- Friedman, E., Krieger, D., Mezey, E., Leranath, C., Brownstein, M. y Palkovits, M. (1983). Serotonergic innervation of the rat pituitary intermediate lobe: decrease after stalk section. *Endocrinology*. 12:1943--1947.
- Fritschy. JM, y Grzanna, R. (1989). Immunohistochemical analysis of the neurotoxic effects of DSP₄ identifies two populations of noradrenergic axon terminals. *Neuroscience*. 30(1): 181-197.
- Galvez, JF. (2005). Trastorno por estrés y sus repercusiones neuropsicoendocrinológicas. *Revista Colombiana de Psiquiatría*. 23(1): 24.
- Glitler, MS y Barraclough, CA. (1987). Locus coeruleus (LC) stimulation augments LHRH release induced by medial preoptic stimulation. Evidence that the major LC stimulatory component enters contralaterally into the hypothalamus. *Brain Research*. 422: 1-10.
- Gold, PW., Goodwin,FK. y Chrousos, GP. (1988). Clinical and biochemical manifestations of depression. *New England journal of Medicine*. 319(7): 413-429.
- Gómez, M. (2008). Ecografía tridimensional y angiografía power doppler tridimensional en el estudio del cuerpo lúteo y del endometrio meso lúteo en inseminación artificial con estimulación ovárica. Departamento de Obstetricia y Ginecología. (Tesis Doctoral). Universidad Autónoma de Madrid. España.
- Gonzalez, KF. (2017). Estudio de la activación neuronal en la región de POA-AHA resultado del bloqueo de los maCnR y su efecto sobre la cantidad de GnRH. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Harro, J., Pähkla, R., Modiri, AR., Harro, M., Kask, A. y Oreland, L. (1999). Dose-dependent effects of noradrenergic denervation by DSP₄ treatment on forced

swimming and β -adrenoceptor binding in the rat. *Journal of Neural Transmission*. 106: 619-629

- Helena, CV., Rodrigues, C. y Anselmo-Franci, JA. (2002). Luteinizing hormone and luteinizing hormone-releasing hormone secretion is under locus coeruleus control in female rats. *Brain Research*. 955: 245-252.
- Herbison, AE. (1997). Noradrenergic regulation of cyclic GnRH secretion. *Reviews of Reproduction*. 2: 1-6.
- Herlenius, E. y Lagercrantz, H. (2004). Development of neurotransmitter systems during critical periods. *Experimental Neurology*. 190: S8-21.
- Herrera, D. y Avila, G. (2015). Neurofisiología de la hipersexualidad secundaria al tratamiento de enfermedad de Parkinson.
Recuperado de: https://www.researchgate.net/figure/Figura-3-Illustracion-de-un-corte-sagital-medial-del-encefalo-de-una-rata-que-muestra-el_fig3_283579881
- Hisano, N. (1977). Effects on hamster vaginal development of a single dose of testosterone or estradiol given neonatally. *Acta Anatómica*. 97(4): 361-370.
- Holden, JE., Wagner, MA. y Reeves, BL. (2018). Anatomical evidence for lateral hypothalamic innervation of the pontine A7 catecholamine cell group in rat. *Neuroscience Letters*. 668: 80-85.
- Hunzicker-Dunn, M y Mayo, K. (2006). Gonadotropin signaling in the ovary. En: Kobil and Neill's Physiology of Reproduction. Edits. JD. Neil. Raven Press. EUA. 895-945.
- Husulak, A. (2012). Farmacología de la Reproducción. Temas de farmacología. Cátedra de Farmacología. Facultad de Medicina UNNE. 18: 177-179.
- Itóh, MT. y Iahizuka, B. (2005). Alpha1-Adrenergic receptor in rat ovary: presence and localization. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 240(1-2): 58-63.
- Jaim- Etcheverry G. y Zieher, LM. (1980). DSP4: a novel compound with neurotoxic effects on noradrenergic neurons of adult and developing rats. *Brain Research*. 188: 513-523.
- Jennes, L., Beckman, WC., Stumpf, WE. y Grzanna, R. (1982). Anatomical relationships of serotonergic and noradrenergic projections with the GnRH system in septum and hypothalamus. *Experimental Brain Research*. 46: 331-338.

- Jennes, L. y Conn, PM. (1994). Gonadotropin-Releasing Hormone and Its Receptors in Rat Brain. *Frontiers in Neuroendocrinology*. 15: 51–77.
- Jennes, L., Eyigor, O., Janovick, JA. y Conn, PM. (1997). Brain gonadotropin releasing hormone receptors: localization and regulation. *Recent Progress in hormone Research*. 52: 475-491.
- Jonsson G., Hallman H., Ponzio F. y 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.
- Jorgensen J., Sheikh S., Forman A., Norgard M., Schwartz T. y Ottesen B. (1989). Neuropeptide Y in the human female genital tract: localization and biological action. *Journal Physiology*. 257(2 Pt 1): E220-7.
- Kang, SS., Son, GH., Seong JY., Choi, D., Kwon, HB., Lee, C. y 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.
- Kauffman, AS. y Rissman, E. (2006). Neuroendocrine control of mating-induced ovulation. En: *The Physiology of Reproduction*. Edits. E. Knobil, JD. Neil. Raven Press. EUA. Pág. 2283-2327.
- Kelly, AB. y Watts, AG. (1998). The Region of the Pontine Parabrachial Nucleus Is a Major Target of Dehydration-Sensitive CRH Neurons in the Rat Lateral Hypothalamic Area. *The Journal of comparative neurology*. 394(1): 48–63.
- Kerdelhué, D., Boida, F., Lesieur, P., Pasqualine, C., Ei Abed, A., Lenoir, V., Duillet, P., Chiuch, CM. y Palkovits, M. (1989). Medial eminence dopamine and serotonin neural activity. *Neuroendocrinology*. 49:176-180.
- Kosten, TR., Wahby, V., Giller, EJr. Y Mason, J. (1990). The dexamethasone suppression test and the thyrotropin-releasing hormone stimulation test in PTSD. *Biology Psychiatry*. 28: 657-64.
- Kriegsfeld, LJ., Silver, R., Gores, AC. Y Crews, D. (2002). Vasoactive intestinal polypeptide contacts on gonadotropin-releasing hormone neurones increase following puberty in female rats. *Journal of Neuroendocrinology*. 14: 685-690.

- Kronenberg, HM. Melmed, S., Polonsky, K. y Larsen, P. (2009). Williams tratado de endocrinología. 11ª edición. Editorial Elsevier. España. Pág. 133-135.
- Kushikata, T., Yoshida, H., Kudo, M., Kudo, T., Kudo, T. y Hirota K. (2011). Role of coerulean noradrenergic neurons in general anaesthesia in rats. *British Journal of Anaesthesia*. 107(6): 924-929.
- Lara, HE., McDonald, JK., Ahmed, C. y Ojeda, SR. (1990). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinology*. 127: 2199-2209.
- Levasseur, MC. (1977). Thoughts on puberty. Initiation of the gonadotropic function. *Annual Biology Animal Biochemistry Biophysics*. 17 (3A), 345-361.
- Lin, Y., Sarfraz, Y., Jensen, A., Dunn, AJ. y Stone, EA. (2011). Participation of brainstem monoaminergic nuclei in behavioral depression. *Pharmacology, Biochemistry and Behavior*. 100: 330-339.
- López, F. y Alamo, C. (2009). Agonistas y antagonistas adrenérgicos. En Tratado de Farmacología. Edits. M.Salazar, C. Peralta,FL. Pastor. 2ª edición. Editorial Médica Panamericana. Madrid, España. Pág. 281-285.
- López, MA. (2012). Conocimientos generales: Regulación neurológica y hormonal de la función reproductora. Fisiología de la pubertad y del climaterio. Complejo hospitalario universitario Albacete Servicio de Obstetricia y Ginecología. Sescam. Pág. 1-15.
- López, N. (2012). Biología del desarrollo. Mc Graw Hill. México. Pág. 15-18.
- López, YL., López, K., Arrieta, I., Flores, A., Mendoza, L., Librado, RA, Gutiérrez, R., Domínguez R. y Cruz, ME. (2017). Muscarinic Receptors Types 1 and 2 in the Preoptic-Anterior Hypothalamic Areas Regulate Ovulation Unequally in the Rat Oestrous Cycle. *International Journal of Endocrinology*. 1-9.
- Lyles, GA. y Callingham, BA. (1981). The effect of DSP₄ (N-(2-chloroethyl)- N-ethyl-2-bromobenzylamine) on monoamine oxidase activities in tissues of the rat. *Journal Pharmacology*. 33: 632-638.
- Malamed, S., Gibne, JA. y Ojeda SR. (1992). Ovarian Innervation Develops Before Initiation of Folliculogenesis in the Rat. *Cell and Tissue Research*. 270: 87-93.

- Martins-Aff erri, MP., Ferreira-Silva, IA., Franci, C. y 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.
- McCann, S., Ojeda, S. y Negro, A. (1974). Sex steroid pituitary and hypothalamic hormones during puberty in experimental animals. En: Control of the Onset of puberty. *Endocrinology*. 94:1459-1464.
- McEwen, BS. (2000). The neurobiology of stress: from serendipity to clinical relevance. *Brain Research*. 886(1-2): 172-189.
- Meijs, HMA., Uilenbroek, JThJ., Jong, FH. y Welschen, R. (1973). Plasma oestradiol-17 β and its relationship to serum follicle-stimulating hormone in immature female rats. *Journal Endocrinology*. 59(2): 295-304.
- Merlo, J., Bosquet, J. y Bosquet, E. (2003). Ginecología. 8^aedici n. Editorial Masson. Barcelona, España. P g. 50-68.
- Mezey, E., Leranth, C., Brownstein, MJ., Friedman, E., Krieger, DT. y Palkovits, M. (1984). On the origin of the serotonergic input to the intermediate lobe of the rat pituitary. *Brain Research*. 294(2): 231-237.
- Moshin S. y Pennefather J. (1979). The sympathetic innervation of the mammalian ovary. A review of pharmacological and histological studies. *Clinical and Experimental Pharmacology Physiology*. 6(3): 335-54.
- Obeid, TA., Eid, YZ., El-Abd, EA. y El-Habbak, MM. (2008). Effects of catecholamines on ovary morphology, blood concentration of estradiol-17 β , progesterone, zinc, triglycerides and rate of ovulation in domestic hens. *Theriogenology*. 69(7): 870-876.
- Ojeda, SR. y Advis, JP. (1980). Neuroendocrine control of the onset of puberty in the rat. *Federation proceedings*. 15;39(7): 2365-71.
- Ojeda, SR. y Skinner, MK. (2006). Puberty in the rat. En: The Physiology of Reproduction. Edits. E. Knobil, JD. Neill. Academic. San Diego. P g. 2061–2126.
- Ojeda, SR. y Urbanski, HF. (1994). Puberty in the rats. En: The Physiology of Reproduction. Edits. E. Knobil, JD. Neil. Raven Press. EUA. P g.363-409.
- Ojeda, SR., Urbanski, HF. y Ahmed, CE. (1986). The Onset of female puberty. Studies in the rats. *Recent Progress in Hormone Research*. 42:385-442.

- Ortega, JE. Callado, LF. y Meana, JJ. (2008). El sistema noradrenérgico en la neurobiología de la depresión. *Psiquiatría Biológica*.15(5): 162-174.
- Parkinsonusacs. (2010). Terminación dopaminérgica.
Recuperado de: <https://parkinsonusac.wordpress.com/2010/03/14/terminacion-dopaminergica/>
- Paxinos, G., Watson, C. (2007). *The Rat Brain in Stereotaxic Coordinates*. New York: Academic Press, Spiral Bound.
- Pombo, M., Audí, L., Bueno, M., Calzada, R., Cassorla, F., y Diéguez, C. (2009). *Tratado de endocrinología pediátrica*. 4ª edición. McGraw-Hill España. España.
- Prieto, B. y Velázquez, M. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotropinas. Facultad de Medicina. UNAM. 45(6): 252-257.
- Rance, N., Wise, PM., Selmomonoff, MK. y 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 diestrous day 1. *Endocrinology*. 108: 1795-1802.
- Rayón, MP. (2014). 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. (Tesis de licenciatura). Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM. México.
- Reyes-Ticas JA. Trastornos de ansiedad: Guía práctica para diagnóstico y tratamiento. Biblioteca virtual en salud. Honduras.
Recuperado en: <http://www.bvs.hn/Honduras/pdf/TrastornoAnsiedad.pdf>
- Rho, MJ. y 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.
- Ricu, M. Paredes, A. Greiner, M. Ojeda, SR. y Lara, HE. (2008). Functional development of the ovarian noradrenergic innervation. *Endocrinology* 149: 50-56.
- Ropero, AB. (2019). Los óvulos y sus orígenes (ovogénesis).
Recuperado de: <https://las-hormonas.blogspot.com/2013/11/como-se-producen-los-ovulos-ovogenesis.html>

- Ross, SB. (1976). Long-term effects of N-(2-chloroethyl-N-ethyl-2-bromobenzylamina hydrochloride on noradrenergic neurones in rat and heart. *Brain Journal Pharmacology*. 58: 521-527.
- Ross, MH. y Pawlina, W. (2007). Histología: texto y atlas color con biología celular y molecular. 5ª Edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Pág. 23-28.
- Ross, S. y Stenfors, C. (2015). DSP₄ A Selective Neurotoxin for the Locus Coeruleus Noradrenergic Sistema. A Review of its Mode of Action. *Neurotoxicity Research*. 27: 15-30.
- Rotemberg, E. y Smaisik, K. (2009). Manifestaciones periodontales de los estados fisiológicos de la mujer. *Odontoestomatología*. 11(13): 16-26.
- Rothlin, R. y Tessler, J. (2004). Farmacología. Adrenérgicos y antiadrenérgicos. Pág. 1-37.
- Sadler, TW. (2008). Embriología médica: con orientación clínica. 10ª edición. Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires, Pág. 25-28.
- Sakai, K., Touret, M., Salvert. D., Leger, L. y Jouvet, M. (1977). Afferent projections to the cat locus coeruleus as visualized by the horseradish peroxidase technique. *Brain Research*. 119(1): 21-41.
- Sanchez-Criado, JE. (2003). Fisiología del ovario. En: Fisiología humana. Edit. JA. Tresguerres. 2ª edición. McGraw-Hill Interamerican. Mexico. Pág.1036-1048.
- Sawyer, CH., Markee, JE., y Hollingahead WH. (1947). Inhibition of ovulation in the rabbit by the adrenergic-blocking agent dibenamine. *Endocrinology*. 41: 395-402.
- Shahab, M., Nusser, KD., Griel, LC. y Deaver,DR. (1993). Effect of a single intravenous injection of N-methyl-D, L-aspartic acid on secretion of luteinizing hormone and growth hormone in Holstein Bull Calves. *Journal of Neuroendocrinology*. 5: 469-473.
- Sierra, A., Camacho, I., Escamilla, C., Negrete, JV. y Rodríguez, L. (2009). Plataforma económica para cirugía estereotáxica en rata neonata. *Revisión en Neurociencia*. 48(3): 141-146.
- Silbernagl, S. y Despopoulos, A. (2009). Fisiología: texto y atlas. 7ª edición. Editorial Panamericana. México. Pág. 440.

- Silverman, AJ., Livne, I. y Witki JW. (1994). The gonadotrophin-releasing hormone (GnRH) neuronal systems: immunocytochemistry and in situ hybridization. En: *The Rat Nervous System*. Edits. Paxinos, G. Academic Press. New York. 1683-1710.
- Sleigh, J., Harvey, M., Voss, L. y Denny, B. (2014). Ketamine-More mechanisms of action than just NMDA blockade. *Trends in Anesthesia and Critical Care*. 4: 76-81.
- Sosa, S. (2019). Esteroidogénesis y la salud ovárica - iquimicas. Recuperado de: <https://iquimicas.com/esteroidogenesis-la-salud-ovarica/>
- Steinetz, BC. (1978). Secretion and function of ovarian estrogens. En: *Handbook of Physiology*. Edits. RO. Greep y E. Astwood. American Physiological Society. Washington. Pág. 439-466.
- Sticker, LS., Thompson, DL. y Gentry, LR. (2001). Pituitary hormone and insuline responses to infusion of amino acids and N-methyl-D-L-aspartate in horses. *Journal of animal science*. 79(3): 735-744.
- Szafarczyk, A., Alonso, G., Ixart, G., Malaval, F. y Assenmacher, I. (1985). Diurnal-stimulated and stress-induced ACTH release in rats is mediated by ventral noradrenergic bundle. *Journal Physiology Endocrinology and Metabolism*. 249: 219-226.
- Szawka, RE., Rodovalho, GV., Monteiro, PM., Carrer, HF. y Anselmo-Franci, JA. (2009). Ovarian-steroid modulation of locus coeruleus activity in female rats: involvement in luteinizing hormone regulation. *Journal of Neuroendocrinology*. 21: 279-291.
- Szot, P., Miguelez, C., White, SS., Franklin, A., Sikkema, C., Wilkinson, CW., Ugedo, L. y Raskind, MA. (2010). A comprehensive analysis of the effect of DSP₄ on the locus coeruleus noradrenergic system in the rat. *Neuroscience*. 166: 279-291.
- Tchernitchin, A. y Tchernitchin, X. (1976). Characterization of the estrogen receptors in the uterine and blood eosinophil leukocytes. *Laboratory of experimental Endocrinology*. 32: 1240-1242.
- Téllez, J. (2000). La noradrenalina. Su rol en la depresión. *Revista colombiana de psiquiatría*. 29(1): 50-73.
- Temboursy, MC. (2009). Desarrollo puberal normal. Pubertad precoz. *Revista Pediatría de Atención Primaria*. 11(16): 127-142.

- Tilbrook, JA., Turner, AI. y Clarke, J. (2000). Effects of stress on reproduction in non-rodent mammals: the role of glucocorticoids and sex differences. *Reviews of Reproduction*. 5: 105-113.
- Torres, JM. y Ortega, E. (2003). DHEA, PREG and their sulphate derivatives on plasma and brain after CRH and ACTH administration. *Neurochemical Research*. 28(8): 1187-1191.
- Tresguerres, JAF., Ariznavarreta, C., Cachofeiro, V., Cardinali, D., Escrich, E., Gil-Loyza, PG., Lahera, V., Mora, F., Romano, M. y Tamargo, J. (2005). Fisiología Humana. 3ª edición. Editorial McGraw Hill. España. Pág. 910, 1007-1022.
- Turkstra, JA. y Meloen, RH. (2006). Active immunisation against gonadotropin-releasing hormone, an active tool to block the fertility axis in mammals. *Veterinary sciences tomorrow*.
- Valenzuela, M. Negrete, JV. y Rodríguez, A. (2007). Núcleo Coeruleus. Neurotransmisores, funciones y patología. *Federación Mexicana de Anestesiología*. 19(3): 155-166.
- Van Raaij MTM, Dobbe CJG, Elvers B, Timmerman A, Schenk E, Oortgiesen M, Wiegant VM. (1997). Hormonal status and neuroendocrine response to a novel heterotypic stressor involving subchronic noise exposure. *Neuroendocrinology* 65: 200-209.
- Vantman, DB. y Vega, MB. (2010). Fisiología reproductiva y cambios evolutivos con la edad de la mujer. *Revista Médica Clínica Las Condes*. 21(3): 348-362.
- Vázquez, LA. (2018). Estudio de correlación entre el perfil ginecológico y la hormona ACTH, del Centro Médico ISSEMYM Periodo enero 2016- diciembre 2017. (Tesis de licenciatura). Universidad Autónoma del Estado de México. México.
- Vega, M. (1997). Bases biológicas de la función ovárica. Serie científica básica, Centro de extensión biomédica. Universidad de Chile.
- Welsch, U. (2008). Histología. 2ª edición, Editorial Médica Panamericana. Buenos Aires. Pág. 503.
- Westlund, KN. y Childs, GV. (1982). Localization of serotonin fibers in the rat adenohypophysis. *Endocrinology*. 111(5): 1761-1763.

- Yen, S., Jeffe, R. y Barbieri. R. (2001). Endocrinología de la reproducción; Fisiología, Fisiopatología y Manejo clínico. 4ª edición. Editorial Panamericana, España. Pág. 108-110, 450-620.
- Zhang X., Zuo, DM. y Yu, PH. (1995). Neuroprotection by r(-)deprenyl and N-2-hexyl-N-methypropargylamine on DSP₄, a neurotoxin, induced degeneration of noradrenergic neurons in the rat Locus Coeruleus. *Neuroscience Letters*. 186: 45-48.

ANEXOS



LXII CONGRESO NACIONAL
SOCIEDAD MEXICANA DE
CIENCIAS FISIOLÓGICAS, A.C



OTORGA LA PRESENTE CONSTANCIA A:

Lucia Ivone Pineda Calderas

QUIEN ASISTIÓ Y PRESENTÓ EL TRABAJO:

¿La lesión del locus coeruleus (LC) en la rata infantil modifica la ovulación?

POR:

Pineda Calderas Lucia Ivone, Ayala Escobar María Elena,
Domínguez Casalá Roberto, Monroy Moreno Juana

En la modalidad de cartel durante el LXII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, A. C. del 11 al 15 de agosto del 2019 en la Ciudad de Querétaro, Qro.

Dr. Benjamin Florán Garduño
Presidente de la Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas

Dra. Margarita Teresa de Jesús Barba Casca
Rectora de la Universidad Autónoma de Querétaro



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



Constancia

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través de la Unidad de
Formación Integral

A Lucia Ivone Pineda Calderas, Eloir Gallegos
Pacheco, María Elena Ayala Escobar y Juana
Monroy Moreno

Por su participación en modalidad de **Cartel** con el trabajo
titulado: “*Efectos de la inhibición del sistema noradrenérgico del
núcleo locus coeruleus sobre las funciones del ovario de la rata
prepúber*”, en el marco del **XXIV Foro de Investigación
Escolar en Biología**; organizado por la Carrera de Biología, el
día 9 de agosto del año en curso.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Ciudad de México, 20 de septiembre de 2019.

Dr. Vicente Jesús Hernández Abad

Director



UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO



CONSTANCIA

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través del Departamento
de Educación Continua

a *Juana Monroy Moreno, Lucía Ivonne Pineda Calderas, María Elena Ayala
Escobar*

Por la presentación del **Trabajo en Cartel: Efecto de la Lesión Química Unilateral del Locus Coeruleus (LC) sobre el Sistema Noradrenérgico del Hipotálamo de la Rata Hembra Prepúber**, dentro del 14° Congreso de Investigación, el día 20 de septiembre del año en curso, organizado por la División de Estudios de Posgrado e Investigación de esta Facultad.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 30 de noviembre de 2018.



Dr. Vicente Jesús Hernández Abad
Director





UNIVERSIDAD
NACIONAL
AUTÓNOMA
DE MÉXICO

CONSTANCIA

Que otorga la
FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES ZARAGOZA
a través del Departamento
de Educación Continua

a *Lucia Ivone Pinoda Calderas, María Elena Ayala Escobar,
Roberto Domínguez Casalá, Juana Monroy Moreno*

Por la presentación del Trabajo en Cartel: **Efectos de la Microinyección Unilateral de N-2-Cloroetil-N-Etil-2-Bromobenzilamina (DSP4) en el Núcleo Locus coeruleus (LC) de la Rata Infantil en el Inicio de la Pubertad y Ovulación**, dentro del 13º Congreso de Investigación, organizado por la División de Estudios de Posgrado e Investigación de esta Facultad el 19 de octubre del año en curso.

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”
Ciudad de México, a 20 de octubre de 2017.



Dr. Víctor Manuel Mendoza Núñez
Director

