

23



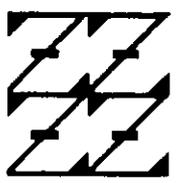
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES \* ZARAGOZA \*

PARTICIPACION DE LA INERVACION SENSORIAL EN EL PROCESO DE FOLICULOGENESIS. LA RATA PUBER COMO MODELO DE ESTUDIO.

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
B I O L O G O
P R E S E N T A :
ROCIO SELENE RAZO SANCHEZ

U N A M
FES
ZARAGOZA



LO NOMBRAMOS JEFE DE NUESTRA DELEGACION

DIRECTORA DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA

28 4491

MEXICO, D.F.

2000



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES  
"ZARAGOZA"

PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN SENSORIAL EN EL PROCESO DE  
FOLICULOGÉNESIS. LA RATA PÚBER COMO MODELO DE ESTUDIO.

Tesis que para obtener el título de Biólogo presenta: Rocío Selene Razo Sánchez.

Directora de tesis: Dra. Leticia Morales Ledesma.

Esta tesis fue realizada en la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Laboratorio de Fisiología Reproductiva, de la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM.

Durante el desarrollo de esta tesis se contó con el apoyo financiero de PAPIIT convenio IN203799 y de CONACYT convenio 29006-N.

*A mis padres*

*con infinito amor y agradecimiento. Dios los bendiga*

*A mi mamá Rosa María Sánchez*

*por brindarme siempre su amistad, apoyo, paciencia y por  
recordarme el valor de las cosas*

*A mi papá Daniel Razo*

*Por motivarnos siempre a superarnos, por sus sabios  
consejos y brindarnos su cariño y amistad.*

*A mis hermanos:*

*por su cariño y comprensión  
y Porque luchan siempre por superarse*

*A Ale. por ser una mujer tan valiente*

*A Adrián: por su incansable alegría*

*A Daniel: por ser tan noble*

*A Saúl:*

*por estar a mi lado y brindarle a mi  
vida amor, anhelos y esperanzas*

*A dos angelitos preciosos que han venido a iluminar nuestras  
vidas*

*A mis amigos Lucero Arroyo y Raúl Sánchez  
Por que a pesar del tiempo y la distancia  
nuestra amistad no parece*

*A Iedira y Cesar por que ahora son como mis hermanos*

*A Leticia Morales por brindarme su apoyo y amistad  
y por tener una de las virtudes más bellas "la sencillez"*

## Agradecimientos

A la Dra. Leticia Morales Ledesma por transmitirme sus valiosos conocimientos, con gran estimación y agradecimiento

A la Dra. Patricia Rosas Saucedo por regalarnos siempre una sonrisa

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá con gran admiración por su trabajo

A los miembros del jurado:

Dra Leticia Morales Ledesma

Dra. Patricia Rosas Saucedo

M. en I.B.S.H. Angélica Flores Ramírez

M. en I.B.S.H. Elia Roldan Reyes

M. C. Raúl Zavala Chavero

Por el tiempo invertidos en la revisión de esta tesis y por sus valiosas sugerencias para enriquecerla

A la Biol. Carolina Morán Raya por su valiosa colaboración en la realización de este trabajo y por su amistad

Al M. en C. Ubaldo Quiróz López por su colaboración en la cuantificación de catecolaminas

Al Biol. Javier Apolonio por su ayuda en la realización de los esquemas

Al laboratorio de Hormonas Esteroides del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán", al Biol. Roberto Chavira y al Dr. Pablo G. Damián-Matzumara por su colaboración para la cuantificación de las hormonas por radioinmunoanálisis

A la técnico María Luisa Illescas Vera por su colaboración en la realización de los cortes histológicos y al personal del bioterio de la FES Zaragoza por su profesionalismo en el cuidado y mantenimiento de los animales.

A todos y cada uno de mis compañeros de la Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción por brindarme su apoyo y amistad.

A las ratitas porque gracias a ellas pude realizar este trabajo.

# ÍNDICE

	Págs.
Resumen	i
Introducción	1
• Origen embrionario de la gónada femenina	1
• Diferenciación del ovario	1
• Pubertad	5
• Generalidades del sistema nervioso	7
• Sistema simpático	8
• Sistema parasimpático	10
• Inervación del ovario	11
• Capsaicina	12
• Efectos biológicos de la denervación sensorial	16
• Participación del nervio vago en las funciones reproductivas	19
Planteamiento del problema	21
Hipótesis	22
Objetivo	22
Metas	22
Material y métodos	23
Resultados	26
Discusión	46
Conclusiones	54
Bibliografía	55

## RESUMEN

Al ovario llega inervación de tipo sensorial por medio del plexo ovárico y del nervio vago y se le encuentra en la periferia de los folículos en desarrollo, a nivel de la glándula intersticial y asociada con los vasos sanguíneos. Las fibras sensoriales pueden ser reconocidas por la presencia de sustancia P (SP), el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) y la somatostatina entre otros.

Para conocer el efecto de la inervación sensorial en los procesos reproductivos se ha utilizado el modelo del animal denervado farmacológicamente, uno de estos fármacos es la capsaicina. La capsaicina es el principal ingrediente de ciertos chiles picantes, su administración causa una depleción de la SP y la destrucción de las fibras sensoriales.

Se ha sugerido que la información sensorial sería la "encargada de informar" al SNC sobre el estado funcional de los folículos ováricos, y dado que se sabe que en la rata el proceso de foliculogénesis se produce en las primeras 48 horas de vida, en este estudio se decidió analizar el efecto de la falta de inervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad, sobre el inicio de la pubertad espontánea, la dinámica de crecimiento y diferenciación folicular al primer estro vaginal, la síntesis de hormonas esteroideas y de gonadotropinas. Así mismo, se evaluó la capacidad reproductiva de las hembras denervadas.

La denervación sensorial realizada al tercer día de vida causó disminución del peso corporal en edades cercana a la pubertad, no afectó la edad de apertura y primer estro vaginal, sin embargo provocó aumento en la tasa ovulatoria, respecto al grupo testigo absoluto (76% vs. 55%,  $p < 0.05$  prueba de  $Ji^2$ ).

La aplicación de capsaicina a las 72 horas de vida no modificó el número total de folículos, pero disminuyó la cantidad de folículos sanos la cual se evidenció en los  $< 349\mu\text{m}$  de diámetro. La denervación sensorial aumentó el contenido pero no la concentración de noradrenalina respecto al grupo testigo absoluto ( $19.9 \pm 2.0$  vs.  $9.6 \pm 1.4$ ,  $p < 0.05$  ANDEVA, seguida por Tukey) y dopamina ováricas respecto al grupo testigo absoluto ( $7.8 \pm 1.7$  vs.  $1.1 \pm 0.09$ ,  $p < 0.05$  ANDEVA, seguida por Tukey).

En estos los animales denervados disminuyó la concentración sérica de  $E_2$  y  $P_4$  respecto al grupo testigo absoluto ( $E_2$   $18.3 \pm 1.6$  vs.  $29.3 \pm 4.1$ ;  $P_4$   $4.0 \pm 0.6$  vs.  $15.7 \pm 2.6$ ,  $p < 0.05$  ANDEVA, seguida por Tukey), y no modificó la de testosterona al primer estro vaginal, tampoco modificó las concentraciones séricas de LH y FSH, ni la concentración de NA, DA y 5-HT hipotálamicas.

En las hembras denervadas con capsaicina al nacimiento como a las 72 horas de vida disminuyó su capacidad reproductiva (nacimiento 13% vs. 86%; tres días 13% vs. 86%,  $p < 0.05$   $Ji^2$ ).

Estos resultados muestran que la denervación sensorial realizada a las 72 horas de vida no modificó el inicio de la pubertad. La inervación sensorial modula de manera estimulante la esteroidogénesis ovárica, el desarrollo de los folículos medianos y mantiene una comunicación con el sistema nervioso central, acerca del funcionamiento de los folículos.

En el animal adulto, la información sensorial participa de manera estimulante en la capacidad reproductiva de las hembras.

## INTRODUCCIÓN

### ORIGEN EMBRIONARIO DE LA GÓNADA FEMENINA

En los mamíferos las células germinales primordiales migran desde su sitio de origen hasta la cresta gonadal, donde son rodeadas por células mesenquimáticas y mesoteliales con las que se asocian, formando el primordio gonadal. En algunas especies como en la rata, las células germinales del ovario entran en la primera fase meiótica, simultáneamente con una rápida formación del sexo gonadal que puede ser reconocido morfológicamente. En estos momentos los ovarios producen poco o nada de esteroides *de novo* y empiezan a sintetizarlos hasta que el folículo se encuentra ya formado (Byskov y Hoyer, 1994).

En el primordio gonadal se lleva a cabo una diferenciación tisular que antecede a la diferenciación sexual de este órgano. Las células somáticas del primordio gonadal son de tres tipos: mesenquimáticas, mesoteliales y endoteliales. Las células mesenquimáticas y mesoteliales, inician una gran actividad proliferativa al llegar las células germinales primordiales, de manera que forman un agregado compacto que se denomina "blastema gonadal". Posteriormente, se inicia el depósito de una delgada lámina basal entre las células del primordio gonadal, que gradualmente lleva a la formación de los cordones sexuales de tipo epitelial. Este tejido queda entonces separado del estroma mesenquimático, situado en el área dorsal de la cresta genital a lo largo del mesonefros. En la rata y el puerco el mesonefros al parecer participa en la formación de la cresta gonadal. Se establece así la gónada indiferenciada con un componente epitelial, entre cuyas células somáticas quedan atrapadas las células germinales primordiales (Merchant, 1991).

### DIFERENCIACIÓN DEL OVARIO

En el humano entre el día 45 y el día 95 de la gestación, la gónada femenina sólo puede diagnosticarse por su carencia de características testiculares. Los ovarios tienen dos funciones que se interrelacionan, a saber la producción de gametos (gametogénesis) y la síntesis de hormonas esteroides (esteroidogénesis). En el

ovario se puede reconocer al hilio ovárico, el cual está unido a la superficie posterior del ligamento ancho por el mesovario. Los nervios y vasos destinados al ovario están contenidos primero en un pliegue peritoneal, el ligamento lumbo ovárico, desde el cual pasan al mesovario y de allí al hilio ovárico. El polo medial del ovario está unido al útero por medio del ligamento útero ovárico. La región central del ovario o médula está formada por tejido conectivo laxo, una masa de vasos sanguíneos relativamente tortuosos, vasos linfáticos y nervios (figura 1). La región periférica o corteza rodea la médula y posee los folículos ováricos incluidos en tejido conectivo compacto. Entre la corteza y la médula no hay un límite bien definido (Ross y col., 1992).

La superficie ovárica está cubierta por un epitelio simple plano o cúbico, que corresponde al mesotelio peritoneal. Entre este mesotelio y la corteza hay interpuesta una capa de tejido conectivo denso llamado túnica albugínea. En el estroma de la corteza ovárica están incluidos los folículos ováricos, cada uno de ellos con un ovocito en su interior. El tamaño del folículo indica la etapa de desarrollo en que se encuentra el ovocito. En el humano los primeros estadios de la ovogénesis se producen en los comienzos de la vida fetal, alrededor del día 100 de la gestación, las ovogonias que se encuentran dividiendo por mitosis paulatinamente empiezan a entrar en la profase de la primera división meiótica en la que quedarán detenidas hasta la pubertad (Merchant 1991; Ross y col., 1992). El porcentaje de mitosis que precede a la meiosis varía entre las especies, en la rata después de un periodo muy corto de actividad mitótica se inicia la meiosis, poco después de la diferenciación sexual de la gónada (Byskov y Hoyer, 1994).

En la pubertad los ovarios comienzan una fase de reactivación meiótica que se caracteriza por el crecimiento y la maduración cíclica de pequeños grupos de folículos.

Se pueden identificar tres tipos básicos de folículos ováricos: 1) primordiales 2) en crecimiento, que pueden subclasificarse en primarios y secundarios (antrales) 3) maduros o de Graaf (figura 2) (Ross y col., 1992).

**Folículos primordiales:** aparecen en el estroma de la corteza inmediatamente por debajo de la túnica albugínea. Están formados por una única capa de células foliculares aplanadas que se apoyan sobre una membrana basal, las células foliculares rodean al ovocito. El ovocito mide 30  $\mu\text{m}$  de diámetro y posee un núcleo excéntrico grande con cromatina fina y uno o más nucleolos.

**Folículo en crecimiento:** en un principio, el ovocito aumenta de tamaño y las células foliculares aplanadas circundantes proliferan y adquieren un aspecto cúbico. En este momento la estructura recibe el nombre de folículo primario. A medida que el ovocito crece, aparece entre éste y las células foliculares circundantes una capa homogénea, llamada zona pelúcida.

Por medio de una rápida proliferación mitótica, la capa única de células foliculares da origen a un epitelio estratificado que rodea al ovocito y descansa sobre una membrana basal. Las células foliculares se llaman ahora células de la granulosa. Conforme estas células proliferan, las células estromales que rodean al folículo forman una cubierta, denominada teca folicular, inmediatamente por fuera de la membrana basal (figura 2). La teca folicular se subdivide en dos capas: la interna, que es la más profunda formada por células secretoras y esta muy vascularizada, y la externa o superficial formada de células de tejido conectivo (Burden y col., 1983; Merchant 1991; Ross y col., 1992).

El folículo primario se profundiza en el estroma cortical a medida que aumenta de tamaño, principalmente por proliferación de las células de la granulosa, alcanza un espesor de 6 a 12 hileras celulares y comienzan a aparecer cavidades llenas de líquido, conocidas como cuerpos de Call Exner (Fawcett, 1995).

Mientras el líquido rico en ácido hialurónico llamado líquido folicular, sigue acumulándose entre las células de la granulosa, las cavidades tienden a confluir hasta que queda formada una cavidad semilunar única denominada antro folicular. Esta estructura se llama ahora folículo secundario o antral (figura 2).

A medida que el folículo secundario crece, el antro revestido por varias capas de células de la granulosa, aumenta de tamaño. La capa granulosa tiene un espesor

relativamente uniforme, excepto en la región asociada con el ovocito. Aquí, las células de la granulosa forman un montículo, el cúmulo oóforo, que se proyecta en el antro y rodea al ovocito. Las células del cúmulo oóforo que están en contacto con el ovocito y permanecen con él, después de la ovulación forman la corona radiada.

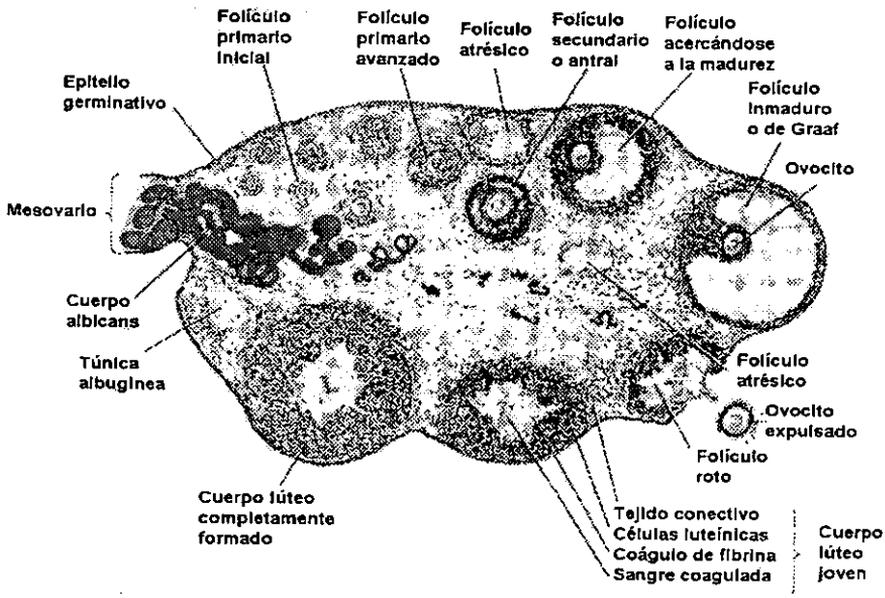


Figura 1. Corte transversal del ovario (Tomado de Ross y col., 1992).

**Folículo maduro o de Graaf:** un folículo maduro mide 10 mm o más, ocupa todo el espesor de la corteza ovárica y se forma una protuberancia en su superficie. Cuando un folículo alcanza su tamaño máximo, disminuye la actividad mitótica de las células de la granulosa. La capa granulosa parece adelgazarse a medida que el antro crece. Mientras continúa agrandándose el espacio entre las células de la granulosa, el ovocito y las células del cúmulo oóforo se van desuniendo de éstas al prepararse para la ovulación (Ross y col., 1992).

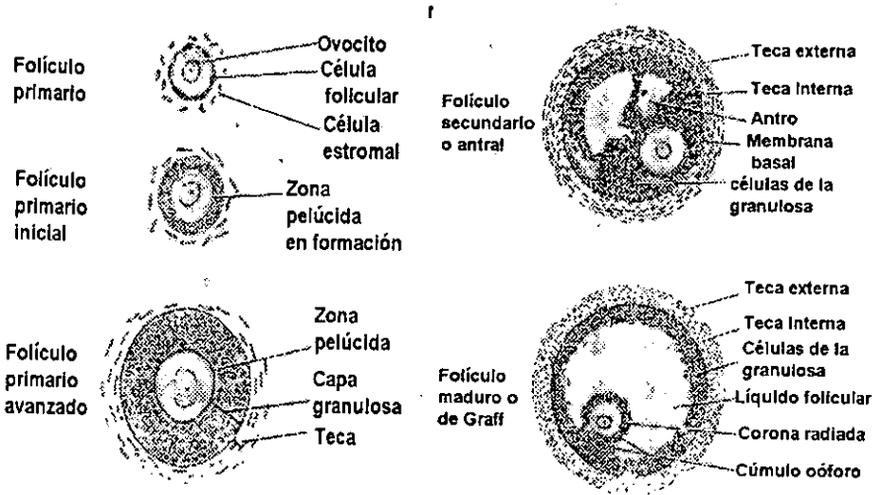


Figura 2. Representación esquemática de las distintas etapas del desarrollo de los folículos ováricos (Tomado de Ross y col., 1992).

**PUBERTAD**

En la rata la pubertad marca el inicio de la vida reproductiva, esta etapa se caracteriza por que se produce la canalización espontánea de la vagina, como una consecuencia de la estimulación estrogénica. La apertura vaginal usualmente ocurre un día antes de la primera ovulación espontánea. Muchos autores coinciden en que la mayoría de las ratas hembra al momento de la apertura vaginal, presentan en el frotis vaginal células cornificadas que tipifican la etapa de estro (Ojeda y col. 1980).

Con base en criterios morfológicos y fisiológicos el grupo de Ojeda (1980), postuló que en el desarrollo de los mecanismos involucrados con el inicio de la vida reproductiva se pueden distinguir cuatro etapas, relacionadas con los distintos componentes del eje hipotálamo-hipófisis-gonada: 1) neonatal, 2) infantil, 3) juvenil y 4) peripuberal.

### ***Etapas Neonatal.***

Este periodo inicia con el nacimiento y finaliza el día siete posnatal. Durante la primera semana de vida posnatal la respuesta del ovario al estímulo gonadotrópico es relativamente baja. No obstante se han observado folículos primordiales en las primeras 24 horas de vida, por lo que se ha sugerido que durante esta etapa del desarrollo el proceso es independiente de las gonadotropinas (Peters y col., 1973; Peters 1979). Se ha postulado a la inervación extrínseca de la gónada como uno de los elementos fundamentales en el control inicial del desarrollo folicular (Dissen y Ojeda 1999). El control del desarrollo folicular por la hormona estimulante del folículo (FSH) se inicia en el 5º día de vida, la FSH estimula la conversión de testosterona a estradiol que es biológicamente inactivo. Los valores de la FSH aumentan y los de la hormona luteinizante (LH) se mantiene bajos. Al final de esta etapa se hace evidente la respuesta esteroidogénica del ovario a las gonadotropinas (Dohler y Wuttke, 1974).

### ***Etapas Infantil.***

Se ubica entre el día ocho y 21 de vida. En esta etapa la concentración plasmática de FSH incrementa alcanzando su máximo al día 12 de vida y comienza a declinar gradualmente. Este evento es muy importante para el reclutamiento de los folículos destinados a ovular en la pubertad. Aunque también se observa un aumento en la concentración de la LH en forma de picos esporádicos, esta elevación es menos evidente que la de la FSH (Hage y col., 1978; Ojeda y col., 1980). Un factor que contribuye a que las concentraciones de gonadotropinas estén altas es el efecto de retroalimentación negativa ejercido por los estrógenos.

En esta etapa la respuesta de la hipófisis a la hormona liberadora de la hormona luteinizante (LHRH) es mayor, debido a la existencia de una gran cantidad de gonadotropos (Hage y col., 1978; Ojeda y col., 1980).

### ***Etapas Juvenil.***

Se localiza entre el día 21 y 30 de vida. Continúa disminuyendo la concentración de la FSH al igual que la de la LH. El tipo de secreción de la LH es de forma pulsátil, con un intervalo interpulso de 30 minutos, hacia el final de esta etapa incrementa sus valores basales, presentando un "pico" por la noche y disminuye por la mañana. En el ovario ya se observa un mayor número de receptores para la LH y se produce una retroalimentación positiva del estradiol sobre la LH. En el ovario existe un alto contenido de receptores a la LHRH que es máximo alrededor del día 25, después el contenido disminuye gradualmente al acercarse el primer estro (Smith-White y Ojeda, 1981). Durante esta etapa el desarrollo del ovario se encuentra bajo la influencia de concentraciones plasmáticas basales de la LH y la FSH (Ojeda y Urbanski, 1994).

### ***Etapas Peripuberal.***

Esta etapa tiene una duración variable que culmina con la primera ovulación. La secreción circadiana de la LH, así como la secreción de prolactina (PRL) son independientes del control esteroideo. La gónada es capaz, gracias a la secreción de la LH, de producir una mayor cantidad de estradiol, el que a su vez causa una retroalimentación positiva sobre la LH y la FSH (Urbanski y Ojeda, 1985). En el ovario existe un mayor número de receptores para la LH y la FSH, lo que se traduce en una máxima respuesta esteroideogénica. Las concentraciones de estradiol, progesterona y testosterona aumentan. Cuando las concentraciones de esteroides son las adecuadas comienza la descarga de la LHRH que culmina con el "pico" de gonadotropinas y la consecuente primera ovulación (Mathews y col., 1987).

Tanto la PRL como la hormona del crecimiento contribuyen a la maduración del ovario facilitando los efectos de las gonadotropinas (Ojeda y Urbanski, 1994).

## GENERALIDADES DEL SISTEMA NERVIOSO

Para facilitar el estudio del sistema nervioso se le ha dividido en dos grandes partes conformadas por: el sistema nervioso central (SNC) en el cual sus células se encuentran en el cerebro y la médula espinal; y el sistema nervioso periférico (SNP) que consiste de nervios sensoriales periféricos y de nervios motores los cuales se extienden hacia todo el cuerpo desde el SNC hasta sus órganos blanco (Dodd y Role, 1991; Brown, 1994).

A su vez el sistema nervioso periférico tiene dos divisiones: la somática y la autónoma. La división somática recibe información sensorial (aférente) de los órganos de los sentidos y controla el rendimiento motor (eferente) del músculo esquelético, a través de 12 pares de nervios craneales y 31 pares de nervios espinales (Brown, 1994). Las funciones que realiza el sistema somático están bajo un control voluntario, por lo que también se le llama "sistema motor voluntario". Todas las neuronas de este sistema se encuentran localizadas dentro del SNC, ya sea en el núcleo motor craneal o en el asa ventral de la médula espinal. El camino aférente que tiene este tipo de inervación hacia el músculo esquelético es monosináptico (Dodd y Role, 1991).

La división autónoma controla el músculo liso, el cardíaco y las glándulas exócrinas; la función que realiza esta división no está sujeta a un control involuntario por lo que se le llama "sistema motor involuntario". En el sistema motor visceral la trayectoria aférente al órgano blanco es bisináptico. Para realizar su función este sistema, las neuronas autonómicas son activadas por columnas de neuronas preganglionares las cuales se encuentran dentro del núcleo del tallo cerebral y la médula espinal, estas neuronas proyectan sus fibras preganglionares hacia un ganglio autonómico externo al SNC el cual puede encontrarse cerca o lejos de su órgano blanco, en este ganglio se lleva a cabo una sinapsis de la neurona preganglionar con una posganglionar, la cual a su vez proyecta su fibra posganglionar hacia el órgano blanco (Dodd y Role, 1991; Brown, 1994).

El sistema nervioso autónomo tiene tres divisiones principales: el simpático (o torácico-lumbar), el parasimpático (o craneosacral) y el entérico. Anatómicamente las tres divisiones difieren en la posición de sus neuronas preganglionares y en la organización de las posganglionares (Dodd y Role, 1991; Brown, 1994).

### SISTEMA SIMPÁTICO

Las células preganglionares de la división simpática se extienden desde el primer segmento torácico de la espina dorsal, hasta por debajo del segmento lumbar y gobierna las reacciones de lucha y huida. Como se muestra en la figura 3 los axones de las neuronas preganglionares emergen desde la espina dorsal a través de la raíz ventral para proyectarse por las ramas blancas comunicantes (mielinizadas), hasta el ganglio de la cadena paravertebral (Dodd y Role, 1991).

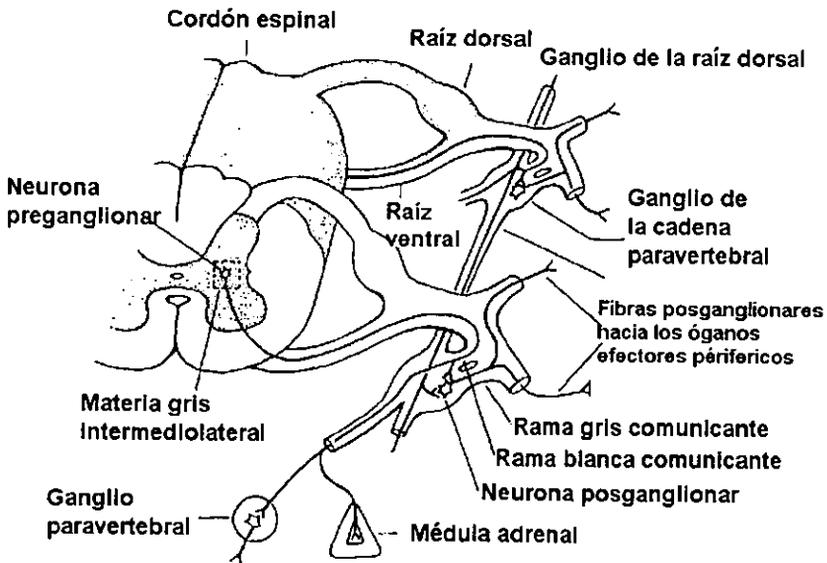


Figura 3. Organización anatómica de las proyecciones de los axones simpáticos preganglionares y posganglionares (Tomado de Dodd y Role, 1991).

En el ganglio paravertebral las neuronas preganglionares hacen sinapsis con neuronas posganglionares, cuyos axones salen del ganglio a través de la rama gris comunicante (figura 3) y estas fibras posganglionares inervan estructuras en la cabeza, viajando a lo largo de la arteria carótida, y algunos órganos blanco como son: vasos periféricos y craneales, órganos viscerales y glándulas de la cabeza y pecho incluyendo glándulas salival y lagrimal, etc., e inervan el resto del cuerpo viajando por los nervios periféricos espinales (Dood y Role, 1991).

Las neuronas posganglionares simpáticas actúan sobre sus órganos blanco por medio de neurotransmisores de los cuales el más utilizado es la noradrenalina aunque también utiliza otros de origen peptídico (Dood y Role, 1991).

### **SISTEMA PARASIMPÁTICO**

Los cuerpos celulares de las neuronas parasimpáticas están localizados dentro del tallo cerebral en varios núcleos y en los segmentos S2-S4 de la espina dorsal (Dodd y Role, 1991; Brown, 1994;), y contienen principalmente inervación sensorial; estos son nervios no mielinizados los cuales se proyectan desde el corazón, pulmones, tracto gastrointestinal, tejidos glandulares, etc. hasta el ganglio sensorial autonómico. Las aferencias sensoriales son llevadas a la médula espinal y al cerebro por los nervios vago, pélvico, esplácnico y por otros nervios autonómicos (Brown, 1994). Las neuronas posganglionares, actúan sobre sus órganos blanco por medio del transmisor acetilcolina (Ach) y uno o más de naturaleza peptídica (Dodd y Role, 1991).

El nervio trigémino es el principal nervio sensorial de la cabeza, sus prolongaciones nerviosas forman los nervios oftálmicos y maxilar y el componente sensorial del nervio mandibular, este nervio es el responsable de la sensibilidad general de la piel de la cara y de la frente, del cuero cabelludo hasta el vértice de la cabeza, la túnica mucosa de las cavidades orales y nasal, los senos paranasales y los dientes (Barr y Kierman, 1986).

El sistema nervioso periférico se caracteriza por poseer neuronas aferentes primarias que se clasifican en varios grupos de acuerdo a criterios morfológicos, fisiológicos, funcionales y neuroquímicos (Holzer, 1991).

De acuerdo a su morfología, las neuronas aferentes primarias pueden dividirse en neuronas tipo A, las que tienen un soma largo y claro y las neuronas tipo B con un soma pequeño y oscuro. También pueden dividirse de acuerdo al diámetro de las fibras en: 1) mielinizadas gruesas 2) mielinizadas delgadas y 3) no mielinizadas delgadas.

Fisiológicamente las fibras mielinizadas gruesas tienen una alta velocidad de conducción y transmiten información mecánica asociada a receptores al frío desde la piel y músculo, por estas características se les clasifica como fibras-A $\alpha\beta$ . Las fibras no mielinizadas delgadas, llamadas fibras-C, tienen una baja velocidad de conducción y son nociceptores primarios los cuales responden a estímulos térmicos, mecánicos nocivos y químicos. En general estos receptores responden a agentes nocivos e irritantes, causantes de dolor y escozor. Las fibras pequeñas mielinizadas conducen a velocidades intermedias y transportan ambos tipos de información por lo que se les designa como fibras A $\delta$  (Holzer, 1991).

Las neuronas aferentes primarias también pueden ser diferenciadas por su ultraestructura y por sus propiedades bioquímicas e histoquímicas. Un gran número de marcadores bio e histoquímicos han sido asociados con este tipo de neuronas. En la rata las neuronas tipo-A pueden ser marcadas selectivamente con RT97 (Holzer 1991). Los principales marcadores para las neuronas tipo B son la sustancia P (SP), la neuroquinina A, el péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), la galanina, el polipéptido intestinal vasoactivo (VIP) y la somatostatina los cuales intervienen en la comunicación de neuronas sensoriales primarias con otras células neurales y no neurales (Dees y col., 1985, 1986; Ahmed y col., 1986; Calka y col., 1988; Holzer, 1991).

## INERVACIÓN DEL OVARIO

El ovario de los mamíferos recibe inervación simpática por dos vías, la del plexo ovárico y la del nervio ovárico superior. La primera es una extensión de los plexos aórtico y renal y sus cuerpos celulares que llegan al ovario, se encuentran en los segmentos T-10 y T-11 de la médula espinal. Las fibras que llegan por el nervio ovárico superior están presentes en los segmentos T-7 a L-2 del ganglio de la raíz dorsal y de los segmentos T-10 a L-3 del ganglio paravertebral (Lawrence y Burden, 1980; Klein y Burden, 1988).

Las gónadas también reciben inervación parasimpática, aportada por el nervio vago (que se origina a nivel del segmento T-10 de la médula espinal) y/o por los segmentos S2 a S4 de la médula espinal. Las fibras sensoriales acompañan a las fibras simpáticas y entran al cordón espinal en el segmento T-10 (Burden, 1978).

De acuerdo con la descripción clásica, las fibras nerviosas adrenérgicas simpáticas están estrechamente relacionadas con la teca de los folículos en los diferentes estados de desarrollo, sin embargo no penetran en la capa de la granulosa ni se localizan en el cuerpo lúteo (Burden, 1978). Al momento, no-se conoce con exactitud la localización anatómica de las fibras sensoriales, la mayor parte de las evidencias indican que se encuentran asociadas con los vasos sanguíneos. Sin embargo, por estudios inmunohistoquímicos se ha mostrado su presencia en la periferia de los folículos y a nivel del tejido intersticial (Calka y col., 1988). El papel predominante de las fibras sensoriales contenidas en el ovario es la regulación del tono vascular dentro del microambiente de la gónada, el cual puede tener importancia fisiológica en el desarrollo prepuberal del ovario, el ciclo estral o la hipertrofia compensadora del ovario (Calka y col., 1988).

Malamed y colaboradores (1992) señalan que en el ovario de la rata los folículos están ausentes en el primer día de vida, la formación de éstos incrementa rápidamente 36 horas después del nacimiento en donde hay cerca de 500 folículos por ovario, y 12 horas después se pueden apreciar cerca de 1300 folículos. Sin embargo, en el ovario fetal ya existen fibras nerviosas del tipo catecolaminérgico,

identificadas por la actividad inmunoreactiva a la tirosina hidroxilasa (enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas). Los receptores a las gonadotropinas recién se pueden detectar a partir de los 4 días de nacidas (Ojeda y Urbansky, 1994), por lo que se sugiere que la regulación inicial del crecimiento del compartimiento folicular es más de tipo neurogénico que endócrino (Malamed y col., 1992).

En el estudio de la participación de la inervación sensorial sobre las funciones del aparato reproductor, se ha utilizado el modelo del animal denervado farmacológicamente. De las sustancias selectivas para destruir las fibras sensoriales se encuentra la capsaicina (Burks y col., 1985 y Holzer, 1991).

## CAPSAICINA

La capsaicina es el principal ingrediente de ciertos chiles picantes del género *Capsicum*, es un derivado de la Vanillilamida 8-metil-N-Vanillyl-6-nonenamida. Está constituida por una cadena carbonada que contiene un doble enlace y una amida secundaria junto con un radical fenol en uno de sus extremos el cual también tiene un grupo cetónico en posición meta a la cadena (figura 4). Al romperse el doble enlace presente en la cadena se puede llegar a formar la dihidrocapsaicina (DHC) o la <sup>3</sup>H DHC. La acción picante e irritante del capsicol, un extracto de la capsaicina, es mediada principalmente por los nervios sensoriales (Burks y col., 1985; Holzer, 1991).

La capsaicina ejerce su efecto neurotóxico sobre las fibras aferentes pequeñas no mielinizadas, causando una degeneración selectiva de fibras C y A  $\delta$  y de las neuronas tipo B (Ralevic y col., 1995). Estas neuronas actúan mediante la liberación de neurotransmisores como: la sustancia P, el CGRP, la somatostatina, el VIP y la colecistokinina (Holzer, 1991). A pesar de la gama de péptidos sintetizados en las neuronas sensoriales primarias, se considera a la sustancia P dentro de los

marcadores clásicos para este tipo de inervación (Dees y col., 1985,1986; Ahmed y col., 1986; Calka y col., 1988; Holzer, 1991).

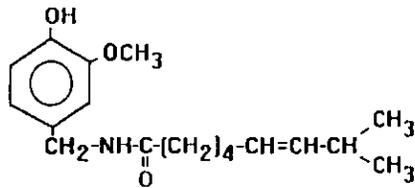


Figura 4. Estructura de la capsaicina (Tomado de Burks y col., 1985).

Calka y colaboradores en 1988 mostraron que la SP y CGRP coexisten en el soma de las neuronas localizadas en el ganglio de la raíz dorsal, el cual manda axones sensoriales al ovario vía el plexo ovárico, y son liberados de las células del ganglio trigeminal en respuesta a la elevación de potasio.

El tratamiento con capsaicina causa una depleción de la SP en neuronas sensoriales primarias del nervio vago, de la porción central del cordón espinal y de ciertas regiones del cerebro que contienen SP. Existen controversias sobre el efecto de la capsaicina en el SNC. Saria y colaboradores (1982) indican que la capsaicina pasa con facilidad al cerebro, Ritter y Dinh (1988) muestran un efecto neurotóxico sobre el núcleo supramamilar, mientras que otros autores utilizando modelos *in vitro* indican que no causa liberación de SP en el hipotálamo y sustancia nigra lo que les permite sugerir que las neuronas sensoriales primarias tienen un sitio de reconocimiento específico para la capsaicina (Jessell y col., 1978; Gamse y col., 1980; Nagy y col.,1980).

Por otro lado, se ha observado que después del tratamiento con capsaicina la reorganización del sistema aferente primario está indicada por la disminución en el número de células pequeñas en los ganglio sensoriales y de fibras nerviosas aferentes no mielinizadas. Todo esto está asociado con un incremento numérico de las células del ganglio de la raíz dorsal, las cuales son de tamaño y tinción

intermedios, por lo que la capsaicina causa un daño o bien disfunción celular que precede a la depleción de sus marcadores peptídicos (Bittner y LaHann, 1985; Lembeck y Donnerer; 1981; Gamse y col., 1982; Maggi y col., 1987 b,c).

La capsaicina interactúa con los componentes de membrana de las neuronas sensoriales, sin la intervención de un segundo mensajero, inhibiendo el transporte retrógrado de los factores neurotróficos, los cuales son esenciales para mantener la síntesis de los neurotransmisores en el cuerpo celular del nervio. Uno de estos factores neurotróficos puede ser similar al factor de crecimiento nervioso (NGF), el cual se ha sugerido como uno de los responsables de la supervivencia neural (Burks y col., 1985), por lo que la administración sistémica de NGF protege a las neuronas sensoriales tipo-B de la degeneración inducida por la capsaicina en la rata recién nacida, e impide la depleción de la SP de las neuronas sensoriales, antagonizando la acción de la capsaicina (Otten y col., 1983).

La capsaicina puede ejercer un efecto local sobre la membrana neural y producir una intensa estimulación del nervio con una depolarización inicial tanto del axón como del soma de las neuronas aferentes primarias. Esta depolarización deriva de una corriente interna la cual es seguida por una corriente externa (Bleakman y col., 1990; Dray y col., 1990; Docherty y col., 1991). Debido a que la corriente interna esta asociada con un incremento en la conductancia, esto puede provocar que los canales iónicos se abran.

La activación de una conductancia catiónica no selectiva, inducida por la capsaicina, conduce a un incremento sostenido en la concentración intracelular de calcio libre (Bleakman y col., 1990; Dray y col., 1990) y la entrada neta de calcio a la célula (Wood y col., 1988, 1989; Winter y col., 1990). La acumulación excesiva de calcio dentro de las células es extremadamente tóxica y parece ser un proceso final común por el cual las toxinas causan la degeneración y muerte celular (Kamakura y col., 1983; Schanne y col., 1979).

Se ha observado que cuando se administra capsaicina y se induce la eliminación de neuronas aferentes existe un incremento en la densidad de las

terminales nerviosas simpáticas y en el contenido de sus transmisores, por lo que existe una relación aparentemente recíproca entre las terminales periféricas simpáticas y las neuronas sensoriales, esto se podría deber a la competencia de las neuronas sensoriales y simpáticas por el NGF, el cual podría causar la eliminación de una población de fibras nerviosas y aumentar la viabilidad de la otra (Terenghi y col.,1986; Nielsch y Keen, 1987; Luthman y col.,1989; Aberdeen y col.,1990).

La aplicación de capsaicina produce excitación de varias neuronas sensoriales y una pronunciada sensación de calor, sin embargo también puede prevenir la repolarización de la neurona o interrumpir la función normal lo que ocasiona insensibilidad térmica ante una estimulación (Burks y col., 1985). Se ha observado que la capsaicina también causa una deficiencia permanente en la sensibilidad ante el dolor inducido químicamente, pero no tiene efecto ante estímulos mecánicos (Nagy y col., 1980). En especies susceptibles la exposición repetida a la capsaicina puede producir insensibilidad a la misma y daños morfológicos temporales o permanentes de ciertas clases de nervios sensoriales. También conduce a la depleción de uno de los principales marcadores que es la SP, el cual es depletado en el cordón espinal dorsal y especialmente en el ganglio de la raíz dorsal, sin embargo no tiene efectos sobre la concentración de este péptido en el tejido gastrointestinal, en el cerebro o en el cordón espinal ventral (Burks y col., 1985).

La aplicación de capsaicina también induce depleción en la concentración del CGRP en el cuerno de la raíz dorsal 10 días después del tratamiento, sin embargo, el CGRP en contraste con la SP puede retornar a sus concentraciones normales después de un período postratamiento de 6 a 16 semanas (Diez Guerra y col.,1988; Hammond y Ruda, 1989).

Cuando la dosis de capsaicina es mayor a 50 mg/kg de peso corporal, las fibras no-mielinizadas de la raíz dorsal son reducidas de un 72% ( Arvidsson y Ygge,1986) a un 95% (Lawson y Nickels,1980; Nagy y col.,1981,1983; Holje y

col.,1983) y las fibras mielinizadas A  $\delta$  son reducidas de un 10% ( Jancsó y col.,1980) a un 40% (Lawson y Nickels, 1980; Nagy y Hunt, 1983; Nagy y col.,1983).

El tratamiento con capsaicina a ratas recién nacidas esta asociado con una deficiencia funcional y sensorial permanente que se traduce en cambios en la permeabilidad vascular, en la actividad de los músculos cardiacos, bronquial y visceral y en la actividad del sistema inmune (Chahl, 1988; Holzer, 1988; Donnerer y col.,1990). Otras consecuencias de la administración de la capsaicina es el aumento en la vulnerabilidad de la mucosa gástrica (Holzer y Sametz, 1986) y la presencia y persistencia de lesiones en la cornea, lo que refleja el papel trófico de las terminales nerviosas sensoriales en estos tejidos (Gamse y col.,1981; Kjartansson y col.,1987; Maggi y col.,1987a; Ogilvy y col.,1991; Shimizu y col.,1984).

Además de la información ya señalada, existen evidencias en la literatura que muestran que el aparato reproductor posee inervación sensorial, la cual modula algunas de sus funciones (Traurig y col., 1983; Nance y col., 1987).

#### **EFFECTOS BIOLÓGICOS DE LA DENERVACIÓN SENSORIAL**

En ratas que han sido inyectadas con capsaicina en una dosis de 50 mg/kg de peso en el segundo día de vida, se causa una permanente y marcada depleción de cerca del 50% en el contenido de sustancia P en neuronas sensoriales primarias y con esto otras alteraciones relacionadas con el crecimiento y reproducción del animal. Durante el desarrollo, estas ratas muestran un peso corporal mucho más bajo respecto al registrado en las hembras tratadas con vehículo y un retraso en la apertura vaginal (inicio de la pubertad) de aproximadamente 4 días (Traurig y col., 1984a).

Cuando las ratas denervadas al nacimiento son colocadas con el macho a las 10-12 semanas de edad y se les realiza frotis vaginales se observa que los ciclos estrales son normales, sin embargo, la proporción de ratas preñadas (confirmada por la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal), durante la tarde del

proestro es significativamente menor comparadas con las de las ratas control. Con estos resultados se ha sugerido que el tratamiento neonatal con capsaicina impide la implantación por desensibilización del cervix a los estímulos de la cópula o bien, que se debe a la disminución de la respuesta decidual (Traurig y col., 1984a).

La etapa neonatal representa un período crítico durante la ontogenia de las neuronas aferentes primarias no mielinizadas, especialmente vulnerables a la capsaicina. Experimentos realizados en la vejiga urinaria de la rata, sugieren que existen dos poblaciones de neuronas aferentes sensitivas al fármaco, una población que es sensitiva a la acción neurotóxica de la capsaicina en todas las edades de la vida y la otra que es vulnerable sólo en la rata recién nacida (Maggi y col., 1987b, 1989; Maggi y Meli, 1988; Szolcsányi, 1990).

Al administrar capsaicina en una dosis 50 mg/kg de peso a ratas de 1 a 20 días de edad se observa que el efecto neurotóxico es independiente del estado de desarrollo del sistema nervioso, y que la administración de capsaicina a ratas de más de 14 días de edad no induce la degeneración de las fibras sensoriales o lo hace en menor grado. Otros estudios muestran que el tratamiento a ratas de 2 a 10 días de edad conduce a una depleción permanente en la quimionocicepción (Jancsó y col., 1977, 1980; Gamse y col., 1980; Nagy y col., 1980) mientras que, en ratas de 20 días o más, e incluso en la edad adulta, se reduce reversiblemente la quimionocicepción (Jancsó, 1960; Jancsó y col., 1977) e incrementan las concentraciones de SP en las vías sensoriales (Gamse y col., 1980). Esto demuestra que el número de células sensoriales que degeneran en respuesta al tratamiento con capsaicina disminuye gradualmente en el curso de la vida posnatal, por lo que se asume que los receptores a capsaicina experimentan cambios significativos en su estructura durante el desarrollo del animal (Jancsó y Király, 1981).

Cuando la capsaicina es administrada en animales adultos la degeneración de somas y axones es menor comparada con el animal denervado en la etapa neonatal (Jancsó y col., 1977, 1980, 1985, 1987), también se observa una recuperación de los efectos causados, lo cual puede tomar varias semanas o

meses. Con lo que se ha probado el débil efecto del fármaco en el animal adulto para producir daños morfológicos de las neuronas aferentes primarias o bien la falta de plasticidad del sistema nervioso en esta etapa (Szolcsányi y Jancsó-Gábor, 1976; Jansó y col.,1977; Gamse y col., 1980,1981; Gamse, 1982; Bittner y LaHann, 1985; Maggi y col.,1987b; South y Ritter, 1988; Gardiner y col.,1989; Szallasi y col.,1989). y solo una subpoblación de neuronas aferentes sensitivas a la capsaicina parecen ser susceptibles a la degeneración (Jancsó y col.,1985).

En un estudio realizado por el grupo de Nance y colaboradores (1987) se muestra que en la rata adulta la administración de 100-125 mg de capsaicina no tiene efectos sobre el ciclo estral, sin embargo disminuye la respuesta de lordosis, la capacidad de implantación y como consecuencia de la fertilidad. En la rata hemicastrada y tratada con capsaicina no se ha observado un efecto significativo sobre la respuesta de hipertrofia compensadora ovárica.

La sensibilidad a la capsaicina también puede depender, aunque en menor grado, de la especie como es el caso del ratón en el que la acción neurotóxica de la capsaicina es más pronunciada en adultos que en neonatos, inverso a lo observado en la rata (Gamse, 1982), y puede ser influenciada por condiciones experimentales como el uso de anestésicos (Holzer, 1991).

Otra forma de estudiar el papel de la inervación sensorial sobre las funciones moduladas por el eje hipotálamo-hipófisis-gónada, es por la destrucción quirúrgica de las vías sensoriales, tal es el caso de la sección del nervio vago, en el cual el 95% de su información es de tipo sensorial.

## **PARTICIPACIÓN DEL NERVIOS VAGO EN LAS FUNCIONES REPRODUCTIVAS.**

Existen varias evidencias experimentales que apoyan la idea de que la información que llega al ovario por el nervio vago participa en la modulación de los procesos neuroendócrinos vinculados con la reproducción (Lawrence y Burden, 1978; Burden y col., 1981).

Burden y colaboradores (1981) mostraron que en la rata adulta la vagotomía a nivel abdominal provoca alteraciones del ciclo estral. En la rata preñada, este tipo de manipulación quirúrgica induce reabsorción de los fetos, acompañado de una disminución en la concentración plasmática de la LH y de la progesterona (Lawrence y col., 1978). Así mismo, la vagotomía bilateral bloquea la inducción de pseudopreñez, que normalmente se presenta ante el estímulo cervical (Burden y col., 1981). Este conjunto de evidencias parecen indicar que durante la cópula, los estímulos sensoriales que se producen llegan al sistema nervioso central por medio de los nervios vago y pélvico y estimulan al hipotálamo, para que éste mande información a la hipófisis y se liberen las hormonas que son necesarias para llevar a cabo la función reproductiva normal.

Estudios previos de nuestro laboratorio han mostrado que la vagotomía modifica la ovulación espontánea, respuesta que depende del nervio seccionado, así como del día del ciclo estral en el que se efectúe la denervación (Chávez y col., 1987; 1989)

En la rata prepúber la vagotomía abdominal provoca retraso en el inicio de la pubertad (Ojeda y col., 1983; Betanzos y Morales, 1997; Betanzos y col., 1998) y una menor respuesta esteroidogénica ante el estímulo con la gonadotropina coriónica humana (hCG), sin que se modifique la concentración plasmática de gonadotropinas (Ojeda y col., 1983).

## PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Desde hace varias décadas se ha aceptado que en el control de las funciones ováricas (secreción de hormonas y ovulación) interviene el sistema nervioso central por intermedio de sus secreciones hormonales así como la inervación extrínseca de la propia gónada (Domínguez y col., 1991; Gerendai y Halász, 1997; Morales y col., 1993, 1998; Morán y col., 2000a).

Se ha sugerido que en la rata prepúber y adulta la inervación simpática que llega al ovario vía el nervio ovárico superior, modula de manera estimulante la ovulación y el crecimiento folicular (Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993, 1998; Morán, 1996; Morán y col., 2000a).

La inervación sensorial llega al ovario por medio del plexo ovárico, de los nervios vago y pélvico (Dodd y Role 1991; Brown, 1994). En el modelo de la rata prepúber poco se conoce sobre la participación de esta inervación en el funcionamiento de la gónada. Estudios previos de nuestro laboratorio han señalado que la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina al nacimiento, provoca retraso en la pubertad, acompañado por una disminución en el número de folículos (Morán y col., 1998; 2000b). Por otra parte, Malamed y col. (1992) han mostrado que en la rata el proceso de foliculogénesis se produce alrededor de las 48 horas de nacida, por lo que en el presente estudio se decidió analizar los efectos de la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad (una vez determinado el número de folículos primordiales con que contará la hembra durante su vida reproductiva), sobre el inicio de la pubertad (apertura vaginal y primera ovulación espontánea), la respuesta esteroideogénica del ovario y el crecimiento y diferenciación de los folículos al primer estro vaginal. Para inferir si los folículos que están presentes en la etapa adulta son "funcionales" se evaluó la capacidad reproductiva de animales denervados tanto a los tres días de vida como al nacimiento.

## **HIPÓTESIS**

La inervación sensorial del ovario modula de manera estimulante el crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos, por lo que la eliminación de esta información neural provocará enlentecimiento del crecimiento y aumento de la atresia folicular.

## **OBJETIVO**

- Estudiar la participación de la inervación sensorial aferente al ovario, sobre los mecanismos neuroendócrinos que conllevan a la pubertad espontánea de la rata.

## **METAS**

- Analizar los efectos de la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad sobre:
  - la pubertad (evaluada por la edad de canalización de la vagina).
  - la primera ovulación espontánea.
  - el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico al primer estro vaginal.
  - el patrón del ciclo estral en la rata púber y adulta.
  - las concentraciones séricas de hormonas esteroides (estradiol, progesterona y testosterona) y de las gonadotropinas (FSH y LH).
  - las concentraciones de catecolaminas ováricas, e hipotalámicas.

## **HIPÓTESIS**

La inervación sensorial del ovario modula de manera estimulante el crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos, por lo que la eliminación de esta información neural provocará enlentecimiento del crecimiento y aumento de la atresia folicular.

## **OBJETIVO**

- Estudiar la participación de la inervación sensorial aferente al ovario, sobre los mecanismos neuroendócrinos que conllevan a la pubertad espontánea de la rata.

## **METAS**

- Analizar los efectos de la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad sobre:
  - la pubertad (evaluada por la edad de canalización de la vagina).
  - la primera ovulación espontánea.
  - el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico al primer estro vaginal.
  - el patrón del ciclo estral en la rata púber y adulta.
  - las concentraciones séricas de hormonas esteroideas (estradiol, progesterona y testosterona) y de las gonadotropinas (FSH y LH).
  - las concentraciones de catecolaminas ováricas, e hipotalámicas.

## **HIPÓTESIS**

La inervación sensorial del ovario modula de manera estimulante el crecimiento y diferenciación de los folículos ováricos, por lo que la eliminación de esta información neural provocará enlentecimiento del crecimiento y aumento de la atresia folicular.

## **OBJETIVO**

- Estudiar la participación de la inervación sensorial aferente al ovario, sobre los mecanismos neuroendócrinos que conllevan a la pubertad espontánea de la rata.

## **METAS**

- Analizar los efectos de la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad sobre:
  - la pubertad (evaluada por la edad de canalización de la vagina).
  - la primera ovulación espontánea.
  - el crecimiento y diferenciación del folículo ovárico al primer estro vaginal.
  - el patrón del ciclo estral en la rata púber y adulta.
  - las concentraciones séricas de hormonas esteroides (estradiol, progesterona y testosterona) y de las gonadotropinas (FSH y LH).
  - las concentraciones de catecolaminas ováricas, e hipotalámicas.

- Analizar el efecto de la denervación sensorial realizada a los tres días de edad y al nacimiento sobre:
  - la capacidad de cópula (evaluada por la presencia de espermatozoides en la vagina).
  - porcentaje de hembras que llegan a parir.
  - duración de la preñez .
  - número de crías nacidas vivas o muertas.

## **MATERIAL Y MÉTODOS**

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

### **GRUPO TRATADO CON CAPSAICINA**

Ratas de tres días de edad fueron inyectadas una sola vez por vía subcutánea (sc) con 50mg/Kg de peso corporal de capsaicina (derivado de la Vanillilamida 8-metil-N-Vanillil-6-nonenamida, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO. USA). El fármaco se preparó en una solución que contenía 10% de etanol al 100°, 10% de Tween 80 y 80% de solución salina (NaCl 0.9%). Se adicione otro grupo de hembras a las que la denervación se les realizó al nacimiento, y sólo se utilizaron para la prueba de preñez.

### **GRUPO TRATADO CON VEHÍCULO**

Al igual que en el grupo anterior, las ratas fueron inyectadas sc. a las 72 horas de nacidas con el vehículo en el cual se preparó la capsaicina.

### **GRUPO TESTIGO ABSOLUTO**

Este grupo estuvo formado por hembras sin ningún tratamiento, sacrificadas al primer estro vaginal.

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

## PRUEBA DE FERTILIDAD

La prueba de fertilidad se realizó en hembras denervadas al nacimiento o a los tres días de edad.

Al llegar a los tres meses de edad se inició la toma de frotis vaginales al menos durante 12 días, para observar si estos animales fueron ciclicos o no, y en el día del proestro fueron colocadas en presencia del macho, las cruces que se realizaron fueron:

1. hembras intactas o tratadas con vehículo con un macho de fertilidad comprobada.
2. hembras denervadas al nacimiento con un macho de fertilidad comprobada.
3. hembras denervadas a los tres días de edad con un macho de fertilidad comprobada.

Al día siguiente de estar la hembra con el macho se reinició la toma de frotis vaginales, al observar la presencia de espermatozoides se consideró que la hembra quedó preñada y se separó del macho. Se registró la duración de la preñez (la cual se determinó como los días transcurridos entre la presencia de espermatozoides y el día del parto) y el número de crías nacidas vivas o muertas. En el caso de las hembras que presentaron espermatozoides y que no quedaron preñadas, se les colocó por segunda ocasión con el macho.

## PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA

Al primer estro vaginal se registró el peso corporal y los animales fueron sacrificados por decapitación. Se colectó la sangre y se dejó a temperatura ambiente durante 15 minutos, se obtuvo el suero centrifugando a 3500 rpm y se almacenó a -20°C hasta la cuantificación de hormonas. En el tronco se realizó un corte abdominal, se disecaron y pesaron los ovarios y el útero, los resultados se expresaron como pesos absolutos (mg) y relativos (mg/100g de p.c.). Con la ayuda de un microscopio estereoscópico se examinaron los oviductos, en donde se contaron los ovocitos presentes. De cada grupo experimental se colectaron al

azar los ovarios izquierdo y derecho correspondientes a tres animales, se fijaron en solución de Bouin para su posterior estudio morfométrico y los de otros seis animales se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para la determinación de catecolaminas por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC, por sus siglas en inglés). De seis animales se extrajo el cerebro, se colocó en solución salina fría y se procedió a diseccionar el hipotálamo. Las muestras se almacenaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la determinación de dopamina (DA), noradrenalina (NA), serotonina (5-HT) y sus metabolitos por HPLC.

### CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS OVÁRICAS

Los ovarios que fueron almacenados a  $-70^{\circ}\text{C}$  se pesaron en una balanza de precisión ( $0.1 \pm \text{mg}$ ) a cada ovario (izquierdo y derecho) se le agregó 10 ng de dihidroxibenzilamina (DHBA) como estándar interno y se homogeneizó con ácido perclórico ( $\text{HClO}_4$ ) frío al 0.1M con ayuda de un sonicador a 50 ciclos/min. Posteriormente se centrifugó a  $-4^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos a 12,000 rpm. El sobrenadante se adicionó a un tubo que contenía TRIS al 0.05M con un pH de 8.6 y alúmina para extraer a las catecolaminas. Esta mezcla se agitó vigorosamente en un vortex durante 10 minutos. Se desechó el sobrenadante y se hicieron dos lavados sucesivos con agua (grado HPLC). Al precipitado se le adicionó ácido perclórico con el fin de solubilizar las catecolaminas y se centrifugó por un minuto a 12,000 rpm. Finalmente se filtró utilizando una membrana con poro de  $0.2 \mu\text{m}$  y se inyectó la muestra al sistema, sólo se determinaron NA y DA cuyo contenido se expresó en nanogramos y la concentración en nanogramos/mg de tejido.

### CUANTIFICACIÓN DE CATECOLAMINAS HIPOTALÁMICAS

Para la disección del hipotálamo se tomó como límite rostral al quiasma óptico, la Banda diagonal de Broca, comisura anterior y núcleo acumbens. Como límites caudales se tomó a los cuerpos mamilares (Bleier y col., 1979). El hipotálamo se pesó en una balanza de precisión, se homogeneizó con  $\text{HClO}_4$  frío y se

centrifugó a 12 000 rpm durante 30 minutos a  $-4^{\circ}\text{C}$ . Posteriormente, el sobrenadante se filtró y se inyectó. Se cuantificaron noradrenalina, dopamina y sus respectivos metabolitos, el ácido 4, hidroxí-3-metoxifeniletenglicol (MHPG) y el ácido 3,4-hidroxifenilacético (DOPAC). También se determinó el contenido de serotonina (5-HT) y su metabolito, el ácido 5-hidroxí-indolacético (5-HIAA).

## CUANTIFICACIÓN DE HORMONAS ESTEROIDES

La cuantificación de las concentraciones séricas de  $17\beta$ -estradiol, progesterona y testosterona se realizó por radioinmunoanálisis (RIA) utilizando estuches comerciales (Coat-A-Count) con anticuerpo de conejo, anti-estradiol, anti-progesterona y anti-testosterona. A cada estuches se agregó la muestra de suero colocando  $100\mu\text{l}$  para progesterona,  $50\mu\text{l}$  para testosterona y  $100\mu\text{l}$  para estradiol, se agitaron durante un minuto para incubarse a temperatura ambiente durante tres horas. Se decantaron los tubos y limpiaron, finalmente con la ayuda de un contador de centelleo gamma se determinó la cantidad de la hormona problema. Los datos de la concentración de  $17\beta$ -estradiol, se expresaron en pg/ml y los de progesterona y testosterona en ng/ml.

## CUANTIFICACIÓN DE GONADOTROPINAS

La determinación de gonadotropinas se realizó por RIA de doble anticuerpo, con la ayuda de los reactivos rLH-RP2 y rFSH-RP2. A 100 ml de suero, se le adicionaron  $100\mu\text{l}$  de la hormona marcada con  $^{125}\text{I}$  y  $100\mu\text{l}$  del primer anticuerpo de suero de borrego para LH o FSH y se incubaron a temperatura ambiente por 24 horas. Posteriormente se agregaron  $100\mu\text{l}$  del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubaron durante dos horas, los tubos se centrifugaron a 3000 rpm a  $-4^{\circ}\text{C}$  por 30 minutos. El sobrenadante se decantó, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron en un contador de centelleo gamma para su análisis. Los datos de la concentración se expresaron en ng/ml.

## ANÁLISIS MORFOMÉTRICO

Los ovarios fijados se pasaron por alcohol a diferentes concentraciones, para después ser incluidos en parafina y cortados en forma seriada a 10  $\mu\text{m}$  de espesor y teñidos con la técnica de hematoxilina-eosina.

En cada corte histológico se midió, con la ayuda de un ocular micrométrico filar, el diámetro mayor y el perpendicular a éste de todos los folículos cuyo ovocito presentó núcleo y nucleolo bien definidos. Los resultados se expresaron como media  $\pm$  e.e.m. del diámetro folicular promedio.

Los folículos se clasificaron en función de su diámetro promedio de la siguiente manera:

a) chicos, si midieron menos de 350  $\mu\text{m}$  de diámetro. b) medianos entre 350-499  $\mu\text{m}$  c) grandes, si fueron mayores de 500  $\mu\text{m}$  (Morán y col., 2000a).

De acuerdo a los criterios de Hsueh y colaboradores (1994) los folículos fueron clasificados como sanos o atrésicos. Se consideró a un folículo atrésico si presentaba alguna de las siguientes características:

- picnosis nuclear de las células de la granulosa
- descamación de las células de la granulosa
- engrosamiento de las capas de la teca folicular y/o
- alteraciones del ovocito.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

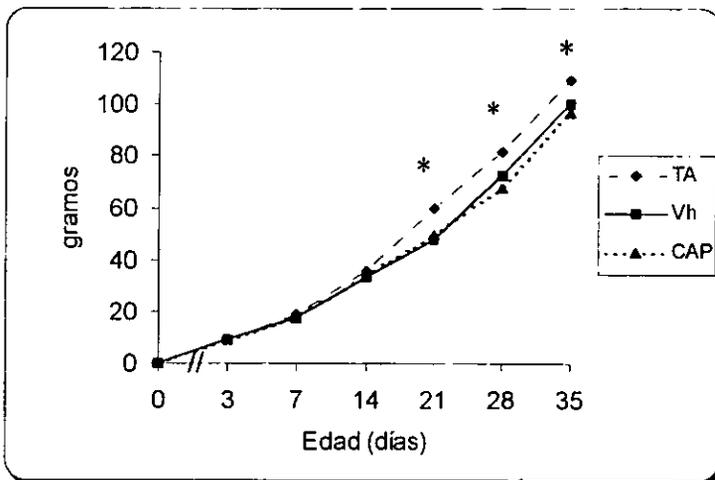
La edad de apertura vaginal y del primer estro así como el número de ovocitos liberados y el número de folículos, fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis seguida por la prueba de "U" de Mann-Whitney. El peso corporal, el peso de los ovarios, del útero, la concentración de catecolaminas, de hormonas esteroides y de gonadotropinas se analizó por una prueba de análisis de varianza multifactorial (ANDEVA), seguida por la prueba de Tukey. La tasa ovulatoria definida como el número de animales ovulantes/número total de animales tratados X 100, la proporción de hembras preñadas y la de crías nacidas vivas o muertas se analizó por la prueba de probabilidad exacta de Fisher o de  $J_i^2$ . En todos los casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas aquellas cuya probabilidad fue menor o igual al 0.05.

## RESULTADOS

**Experimento 1. Efecto de la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad, sobre el crecimiento ponderal y el inicio de la pubertad.**

La administración de capsaicina a ratas de tres días de edad provocó una tasa de mortandad de aproximadamente el 62 % dentro de la primera semana de vida.

En los animales sobrevivientes al tratamiento con capsaicina a los tres días de vida, se observó que el peso corporal desde los tres días de edad hasta los catorce fue semejante a los grupos testigo y vehículo, mientras que a partir de los 21 días las hembras denervadas pesaron menos comparadas con el grupo testigo absoluto (figura 5).



\* $p < 0.05$  vs testigo absoluto (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey).

**Figura 5.** Media  $\pm$ e.m. del peso corporal (g) de ratas Testigo absoluto (TA) o tratadas a los tres días de edad con Vehículo (Vh) o Capsaicina (CAP).

## PUBERTAD

En los animales tratados con capsaicina el peso corporal al primer estro vaginal fue significativamente mayor comparado con los animales testigo absoluto, y no llegó a ser diferente respecto al grupo tratado con vehículo (Tabla 1).

En las hembras denervadas no se modificó la edad de la apertura vaginal ni la del primer estro, comparadas con el grupo testigo absoluto o tratadas con el vehículo (Tabla 1).

**Tabla 1.** Media  $\pm$  e.e.m. del peso corporal, de la edad de la apertura vaginal (EAV) y la edad de primer estro (EPE), de ratas Testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina.

grupo	peso corporal (g)	EAV (días)	EPE (días)
Testigo absoluto	116.7 $\pm$ 3.0	40.3 $\pm$ 0.6	41.6 $\pm$ 0.8
Vehículo	122.7 $\pm$ 4.4	40.9 $\pm$ 0.6	42.3 $\pm$ 0.6
Capsaicina	128.0 $\pm$ 2.3*	42.8 $\pm$ 1.0	44.9 $\pm$ 1.0

\* $p < 0.05$  vs testigo absoluto (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey).

Al momento de la canalización de la vagina, alrededor del 70% de los animales testigo absoluto o tratados con vehículo presentaron un estro vaginal típico, el 30% de las hembras restantes presentaron diestro, y tardaron aproximadamente tres días para mostrar el estro vaginal. En cambio, sólo el 38% de los animales tratados con capsaicina presentaron estro al momento de la apertura vaginal y los demás mostraron un patrón de aciclicidad vaginal, en el cual predominó la presencia de leucocitos con algunas células nucleadas por varios días (Tabla 2).

**Tabla 2.** Ciclos vaginales tomados a partir de la apertura vaginal (AV) de ratas tratadas a los tres días de edad con Capsaicina.

Nº del Animal	AV ↓									
1	D	D	D	E						
2	D	D	D	E*						
3	E									
4	PE	DP	DP	D	E*					
5	E									
6	D	DP	PE	E						
7	DP	DP	D	D	PE	E				
8	DP	D	D	DP	DP	PE	PE	P	E	
9	DE	DP	PE	DP	D	PE*				
10	DP	EP	E							
11	E									
12	E									
13	E									
14	D	D	DP	E						
15	DP	D	PE	E						
16	DP	D	D	PE	E					
17	PE	DE	PE	PE	E					
18	DP	DP	D	DP	EP	E				
19	EP	E								
20	EP	E								
21	E									
22	EP	DP	E*							
23	DP	DP	DP	P	E					
24	DP	DP	DP	P	E					
25	E									
26	E									
27	E									
28	E									
29	E									

Con un asterisco se indican aquellos animales que fueron sacrificados al estro vaginal, sin que le precediera un proestro típico. En este caso las hembras no ovularon.

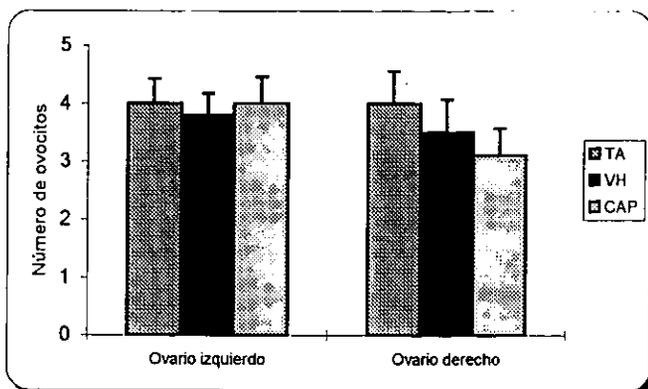
En la tabla 3 se presenta la tasa ovulatoria de los animales denervados por la administración de capsaicina. Como se puede observar, la proporción de animales denervados que ovularon por el ovario izquierdo y derecho fue mayor comparado con el grupo testigo absoluto, y no llegó a ser diferente con respecto al grupo tratado con vehículo. Estas diferencias se mantuvieron cuando los resultados se expresaron agrupando a ambos ovarios.

**Tabla 3.** Proporción de animales ovulantes (número de animales ovulantes/número total) por el ovario izquierdo, derecho o por ambos ovarios de ratas Testigo absoluto, o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

grupo	tasa ovulatoria		total
	ovario izquierdo	ovario derecho	
Testigo absoluto	12/22	12/22	12/22
Vehículo	19/28	19/28	19/28
Capsaicina	22/29*	22/29*	22/29*

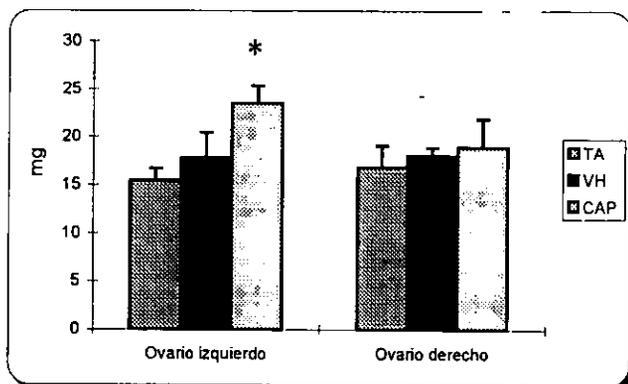
\* $p < 0.05$  vs Testigo absoluto (Prueba de  $J_i^2$ ).

La denervación sensorial no modificó la cuota ovulatoria por el ovario izquierdo o derecho (figura 6). De igual manera, no se observaron diferencias cuando los resultados se expresaron como el número total de ovocitos (testigo absoluto  $8.0 \pm 0.8$ ; vehículo  $7.3 \pm 0.7$ ; capsaicina  $7.2 \pm 0.7$ , NS).



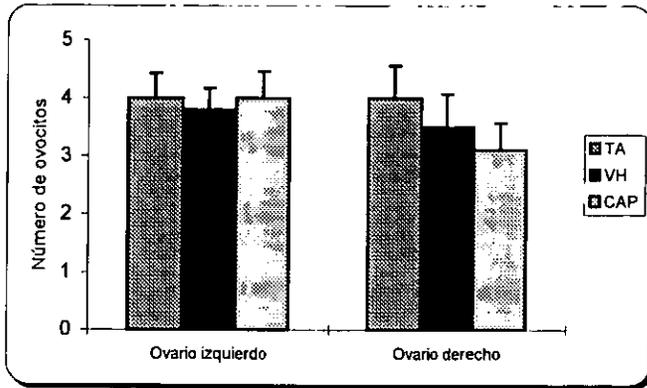
**Figura 6.** Media  $\pm$ e.e.m. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho de ratas Testigo absoluto (TA) o tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.

En las ratas tratadas a las 72 horas de nacidas con capsaicina, el peso absoluto del ovario izquierdo fue significativamente mayor que el de los animales testigo absoluto, mientras que, el peso del ovario derecho no mostró diferencias significativas en los tres grupos (figura 7).



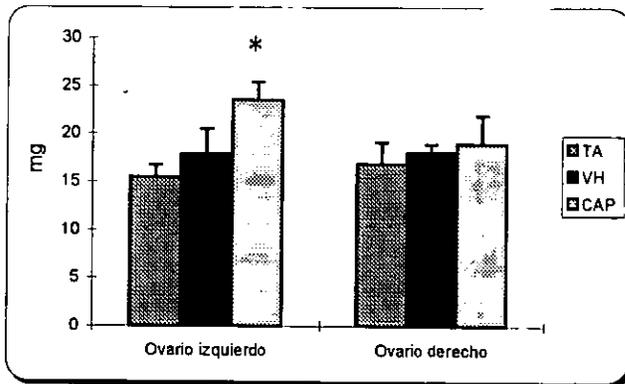
\* $p < 0.05$  vs Testigo absoluto (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey).

**Figura 7.** Media  $\pm$ e.e.m. del peso (mg) del ovario izquierdo y derecho de ratas Testigo absoluto (TA) o tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.



**Figura 6.** Media  $\pm$ e.m. del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo y derecho de ratas Testigo absoluto (TA) o tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.

En las ratas tratadas a las 72 horas de nacidas con capsaicina, el peso absoluto del ovario izquierdo fue significativamente mayor que el de los animales testigo absoluto, mientras que, el peso del ovario derecho no mostró diferencias significativas en los tres grupos (figura 7).



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

**Figura 7.** Media  $\pm$ e.m. del peso (mg) del ovario izquierdo y derecho de ratas Testigo absoluto (TA) o tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.

Cuando el peso de los ovarios se expresó como la masa ovárica no se observaron diferencias entre los animales denervados y los testigo (capsaicina: 42.4±4.2; vehículo: 35.8±2.6; testigo: 32.2±3.7, NS). De igual manera no se modificó el peso del útero (capsaicina: 177.6±7.8; vehículo: 167.3±7.7; testigo absoluto: 157.3±8.9, NS).

Cuando los resultados se reportaron en miligramos por 100 g de peso corporal (pesos relativos) en los animales denervados incrementó significativamente el peso del ovario izquierdo y no se observaron diferencias entre los tratamientos para el peso del ovario derecho, masa ovárica y útero (Tabla 4).

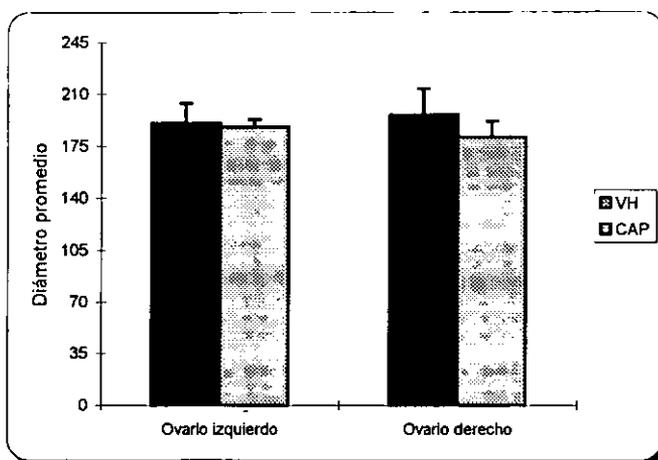
**Tabla 4.** Media ± e.e.m. del peso del ovario izquierdo, derecho y la masa ovárica (mg/100g p.c.) de ratas Testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

grupo	ovario izquierdo	ovario derecho	masa ovárica	útero
Testigo absoluto	13.9±1.20	15.3±2.79	29.2±3.72	135.7±7.53
Vehículo	15.9±1.59	14.7±0.88	28.8±1.80	130.5±5.71
Capsaicina	18.9±1.69*	15.3±2.58	31.1±3.88	144.4±8.10

\* p<0.05 vs. Testigo absoluto (prueba de ANDEVA seguida por Tukey)

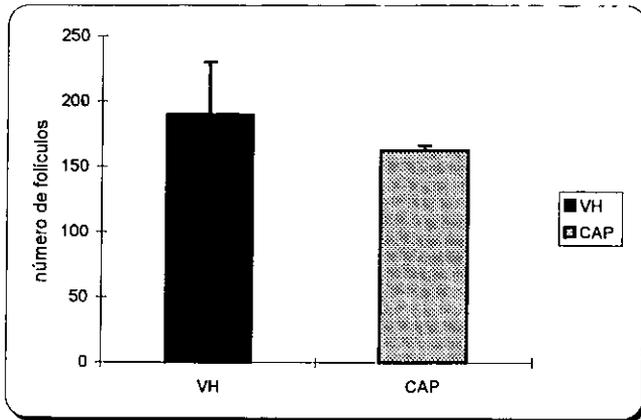
**Experimento 2. Efecto de la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad, sobre el desarrollo y diferenciación del folículo ovárico de la rata púber.**

En los ovarios de los animales tratados con capsaicina, el diámetro promedio de los folículos medidos en el ovario izquierdo y derecho fue similar al grupo tratado con vehículo (figura 8). La denervación sensorial no modificó el número total de folículos (figura 9).

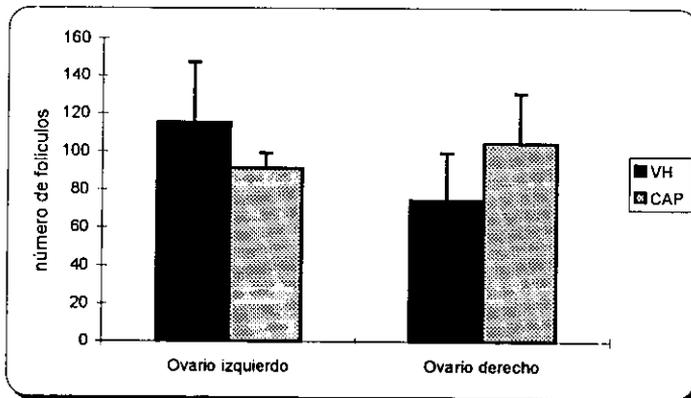


**Figura 8.** Media  $\pm$  e.e.m. del diámetro promedio de los folículos en el ovario izquierdo y derecho de ratas tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.

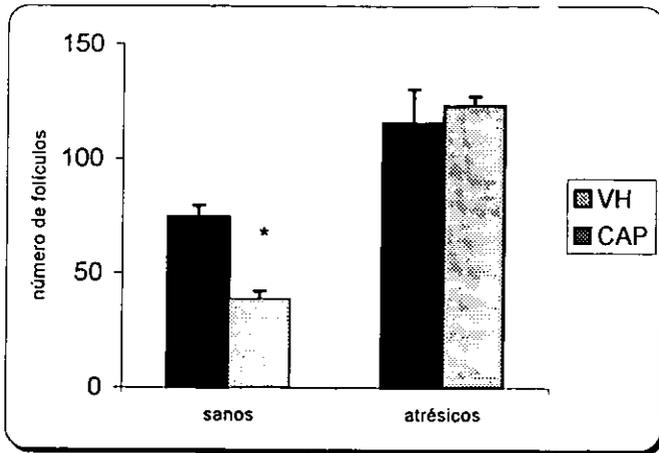
En las ratas tratadas con capsaicina, el número promedio de folículos presentes en el ovario izquierdo y derecho fue semejante al de los animales tratados con vehículo (figura 10). De igual manera, no se modificó la población de folículos atrésicos, sin embargo en los animales denervados el número de folículos sanos disminuyó (figura 11).



**Figura 9.** Media  $\pm$  e.e.m. del número total de folículos en ambos ovarios de ratas tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.



**Figura 10.** Media  $\pm$  e.e.m. del número total de folículos por el ovario izquierdo y derecho de ratas tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.



\* $p < 0.05$  vs Vehículo (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida por "U" de Mann-Whitney).

**Figura 11.** Media  $\pm$  e.e.m. del número total de folículos sanos y atrésicos, por el ovario izquierdo y derecho de ratas tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.

Cuando los folículos sanos se agruparon de acuerdo a su diámetro, se observó en los animales denervados una disminución en el ovario izquierdo del número de folículos menores de  $349 \mu\text{m}$ , mientras que para el ovario derecho la disminución no llegó a ser estadísticamente significativa. El tratamiento con capsaicina no modificó el número total de folículos sanos  $>350 \mu\text{m}$  de diámetro (Tabla 5).

**Tabla 5.** Media  $\pm$  e.e.m. del número total de folículos sanos, agrupados de acuerdo a su diámetro, por el ovario izquierdo y derecho de ratas tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.

		$<349\mu\text{M}$	$>350\mu\text{M}$
Ovario izquierdo	Vehículo	$44.3 \pm 3.18$	$1.7 \pm 1.20$
	Capsaicina	$21.3 \pm 4.91^*$	$3.3 \pm 0.88$
Ovario derecho	Vehículo	$27.3 \pm 7.96$	$1 \pm 1$
	Capsaicina	$13.6 \pm 1.20$	$0.6 \pm 0.88$

\* $p < 0.05$  vs Vehículo (Prueba de Kruskal-Wallis, seguida por "U" de Mann-Whitney).

**Experimento 3. Efecto de la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad, sobre la secreción de catecolaminas ováricas de la rata púber.**

En los animales denervados con capsaicina el contenido de noradrenalina aumentó significativamente para el ovario izquierdo y derecho comparado con el grupo testigo absoluto, y no fue diferente con respecto al grupo inyectado con el vehículo. Este incremento se mantiene cuando el contenido del neurotransmisor se expresa por ambos ovarios (Tabla 6). En cambio, cuando los resultados se expresaron en función del peso del órgano no se observaron diferencias en la concentración de la amina (Tabla 7).

**Tabla 6.** Media  $\pm$  e.e.m. del contenido (ng) de *noradrenalina* en el ovario izquierdo y derecho de ratas testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

grupo	ovarios		total
	izquierdo	derecho	
Testigo absoluto	5.1 $\pm$ 0.7	4.5 $\pm$ 0.7	9.6 $\pm$ 1.4
Vehículo	10.5 $\pm$ 1.0*	7.8 $\pm$ 0.7*	18.3 $\pm$ 1.8*
Capsaicina	12.8 $\pm$ 1.9*	7.7 $\pm$ 0.9*	20.4 $\pm$ 2.2*

\* $p < 0.05$  vs testigo absoluto (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey).

**Tabla 7.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de *noradrenalina* en el ovario izquierdo y derecho de ratas testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

grupo	ovarios		total
	izquierdo	derecho	
Testigo absoluto	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.2
Vehículo	0.7 $\pm$ 0.03	0.5 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1
Capsaicina	0.7 $\pm$ 0.2	0.5 $\pm$ 0.04	1.3 $\pm$ 0.1

En el ovario izquierdo y derecho de los animales denervados aumentó el contenido de dopamina comparado con los grupos testigo absoluto o vehículo (Tabla 8), y sólo aumento la concentración de este neurotransmisor cuando se expresó por ambos ovarios (Tabla 9).

**Tabla 8.** Media  $\pm$  e.e.m. del contenido (ng) de *dopamina* en el ovario izquierdo y derecho de ratas testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

grupo	ovarios		total
	izquierdo	derecho	
Testigo absoluto	0.5 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.0	1.1 $\pm$ 0.1
Vehículo	0.6 $\pm$ 0.4	0.6 $\pm$ 0.2	1.1 $\pm$ 0.2
Capsaicina	1.9 $\pm$ 0.01*	5.9 $\pm$ 1.7*	7.8 $\pm$ 1.7*

\* $p < 0.05$  vs testigo absoluto y vehículo (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey).

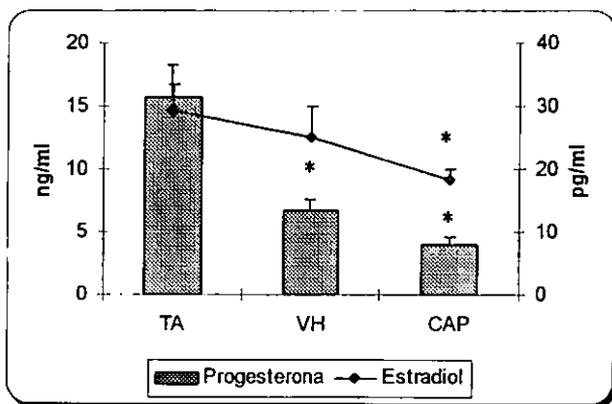
**Tabla 9.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración (ng/mg de tejido) de *dopamina* en el ovario izquierdo y derecho de ratas testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

grupo	ovarios		total
	izquierdo	derecho	
Testigo absoluto	0.04 $\pm$ 0.01	0.02 $\pm$ 0.01	0.06 $\pm$ 0.01
Vehículo	0.04 $\pm$ 0.03	0.04 $\pm$ 0.01	0.07 $\pm$ 0.02
Capsaicina	0.20 $\pm$ 0.12	0.30 $\pm$ 0.15	0.51 $\pm$ 0.09*

\* $p < 0.05$  vs testigo absoluto y vehículo (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey).

**Experimento 4. Efecto de la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad, sobre la secreción de esteroides en plasma de la rata púber.**

En los animales tratados con capsaicina disminuyeron las concentraciones séricas de estradiol y progesterona comparadas con los animales testigo absoluto. En las hembras inyectadas con vehículo disminuyó la concentración de progesterona (figura 12).

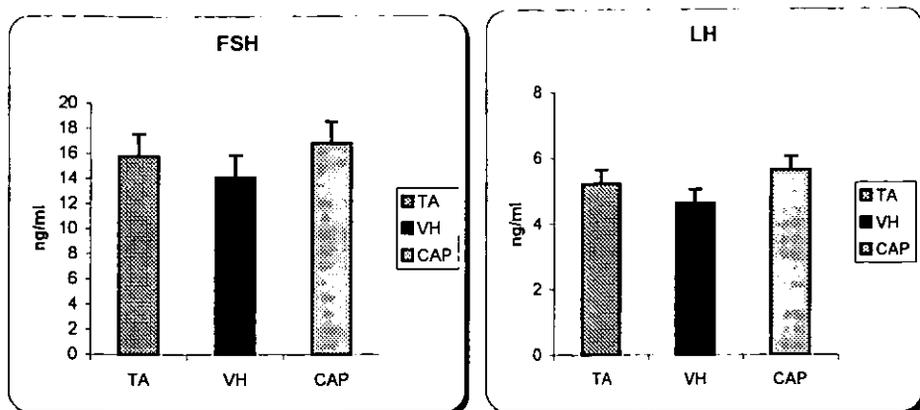


\* $p < 0.05$  vs testigo absoluto (Prueba de ANDEVA, seguida por Tukey).

**Figura 12.** Media  $\pm$  e.e.m. de la concentración sérica de estradiol y progesterona de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.

La denervación con capsaicina no modificó la concentración sérica (ng) de testosterona (Testigo absoluto  $0.04 \pm 0.01$ ; Vehículo  $0.03 \pm 0.01$ ; Capsaicina  $0.02 \pm 0.01$ , NS).

Las concentraciones séricas de LH y FSH no se modificaron en ninguno de los grupos experimentales (figura 13).



**Figura 13.** Media e.e.m. de la concentración sérica (ng/ml) de FSH y LH de ratas testigo absoluto (TA) o tratadas a los tres días de edad con Vehículo (VH) o Capsaicina (CAP) y sacrificadas al primer estro vaginal.

**Experimento 5.** Efecto de la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina a los tres días de edad, sobre la secreción de catecolaminas e indolaminas hipotámicas de la rata púber.

La denervación sensorial no modificó el contenido ni la concentración de noradrenalina y de su metabolito (Tabla 10).

**Tabla 10.** Media  $\pm$  e.e.m. del contenido (ng) y la concentración (ng/mg de tejido) de *noradrenalina* (NA) y de su metabolito (MHPG) del hipotálamo de ratas testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

GRUPO	CONTENIDO		CONCENTRACIÓN	
	NA	MHPG	NA	MHPG
Testigo absoluto	0.390 $\pm$ 0.020	0.058 $\pm$ 0.003	0.012 $\pm$ 0.0004	0.002 $\pm$ 0.0001
Vehículo	0.355 $\pm$ 0.047	0.056 $\pm$ 0.004	0.012 $\pm$ 0.0009	0.0017 $\pm$ 0.0001
Capsaicina	0.358 $\pm$ 0.060	0.058 $\pm$ 0.004	0.011 $\pm$ 0.0017	0.0017 $\pm$ 0.00014

La denervación sensorial no afectó el contenido ni la concentración de dopamina hipotálamica ni el de su metabolito (Tabla 11).

Tabla 11. Media  $\pm$  e.e.m. del contenido (ng) y la concentración (ng/mg de tejido) de *dopamina* (DA) y de su metabolito (DOPAC) del hipotálamo de ratas testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

GRUPO	CONTENIDO		CONCENTRACIÓN	
	DA	DOPAC	DA	DOPAC
Testigo absoluto	0.049 $\pm$ 0.003	0.023 $\pm$ 0.0030	0.0015 $\pm$ 0.0001	0.0007 $\pm$ 0.00008
Vehículo	0.048 $\pm$ 0.005	0.0219 $\pm$ 0.001	0.0015 $\pm$ 0.0001	0.0008 $\pm$ 0.0001
Capsaicina	0.045 $\pm$ 0.003	0.017 $\pm$ 0.0021	0.0013 $\pm$ 0.0001	0.0005 $\pm$ 0.00006

La administración de capsaicina no modificó el contenido ni la concentración de serotonina hipotálamica ni el de su metabolito (Tabla 12).

Tabla 12. Media  $\pm$  e.e.m. del contenido (ng) y la concentración (ng/mg de tejido) de *serotonina* (5-HT) y de su metabolito (5-HTAA) del hipotálamo de ratas testigo absoluto o tratadas a los tres días de edad con Vehículo o Capsaicina y sacrificadas al primer estro vaginal.

GRUPO	CONTENIDO		CONCENTRACIÓN	
	5-HT	5-HTAA	5-HT	5-HTAA
Testigo absoluto	0.191 $\pm$ 0.004	0.197 $\pm$ 0.019	0.0046 $\pm$ 0.001	0.006 $\pm$ 0.0006
Vehículo	0.156 $\pm$ 0.025	0.155 $\pm$ 0.021	0.0045 $\pm$ 0.0005	0.004 $\pm$ 0.0004
Capsaicina	0.173 $\pm$ 0.019	0.218 $\pm$ 0.023	0.0051 $\pm$ 0.0006	0.006 $\pm$ 0.0006

**Experimento 6. Efecto de la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina al nacimiento o a los tres días de edad, sobre el ciclo estral de la rata adulta.**

El ciclo estral de las ratas CII-ZV se caracteriza por presentar dos días de Diestro (representado por leucocitos), seguido por una etapa de Proestro en el cual se observa células nucleadas y finalmente la etapa de Estro caracterizado por la presencia de células anucleadas en forma de escama.

**Ciclo estral de animales adultos intactos**

En las hembras intactas se observó que el 63% de ellas siguió un patrón normal de ciclo estral, con una duración de cuatro días. A estas ratas en el día del proestro se les colocó con un macho de fertilidad comprobada, al observar la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal se separaron y se continuó con la toma de frotis. El 71% de los animales que presentaron espermatozoides quedaron preñados y parieron al llegar el final de la gestación (Tabla 13).

**Tabla 13.** Ciclos vaginales tomados a ratas adultas intactas que presentaron espermatozoides después de ser colocadas con el macho de fertilidad comprobada.

Presencia  
de espermatozoides  
↓

N° animal

1	E	DP												
2	E	DP	DP	DP	D	DP	DP	D	D	D	DP	D	ED	
3	E	DP	DP	DP	DP	DP	D	D	ED	ED	DP	D	D	
4	E	DP	P	P	P	DP	DP	DP	DP	P		ED	EP	
5	E	E	DP	D	P	E	DP	E	EP	E	D	DP	EP	
6	E	DP	DP	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	
7	E	DP	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

En círculo se presentan los animales que parieron.

**Ciclo estral de animales denervados al nacimiento.**

De las ratas que fueron denervadas al nacimiento al llegar a la etapa adulta, sólo una de ellas fue cíclica. En estos animales la citología vaginal no fue muy clara ya que en los frotis se observaron una mezcla de los diferentes tipos celulares, sin embargo se puede apreciar que en este grupo predominó el estro vaginal (Tabla 14).

**Tabla 14.** Ciclos vaginales tomados a ratas adultas que fueron tratadas al nacimiento con Capsaicina.

Se colocó  
al macho  
↓

N° animal		E	DP	PE	E	D	ED	ED	EP	E	ED	D	P	E	DP	P
1																
2		PE	ED	PE	E	D	D	PE	E	DP	ED	D	D	DP	DP	P
3	DP	PE	E	D	D	E	E	ED	ED	PE	E	D	DP	PE	E	DP
4									DP	D	PE	E	D	PE	ED	DP
5	P	E	D	DP	P	E	D	DP	P	E	D	D	P	E	D	P

En sombreado se presentan los frotis de la hembra con ciclos regulares.

A estas ratas se les colocó con un macho de fertilidad comprobada, al observar los espermatozoides en el frotis vaginal, se retiró al macho y se continuó la toma de frotis por aproximadamente 12 días, durante los cuales sólo 2 de las 6 hembras fueron cíclicas (Tabla 15). En estos animales a pesar de haberse observado espermatozoides sólo una de ellas parió al llegar al final de la gestación.

**Tabla 15.** Ciclos vaginales tomados a ratas adultas que fueron tratadas al nacimiento con Capsaicina y que presentaron espermatozoides después de ser colocadas con el macho de fertilidad comprobada.

Presencia  
de espermatozoides

N° animal ↓

1	E	DP	DP	PE	D	D	ED	PE	E				
2	E	DP	P	E	D	DP	P	E	D	DP	P	E	D
3	E	DP	P	E	D	DP	P	E	D	DP	P	E	D
4	E	PE	E	D	DP	PE	E	E	DP	DP	DP	PE	
5	E	DP	D	D	D	D	D	DP	DP				
6	E	PE	D	D	D	D	D	D	D				

En sombreado se presentan los frotis de las hembras con ciclos regulares.

En círculo se presenta la hembra que parió.

**Ciclo estral de animales denervados a los tres días de vida.**

En las hembras que fueron denervadas a los tres días de vida, al llegar a la etapa adulta el 43% de ellas siguió el patrón de ciclo estral, en los animales restantes existió una mezcla de las diferentes etapas (Tabla 16).

**Tabla 16.** Ciclos vaginales tomados a ratas adultas tratadas a los tres días de vida con Capsaicina.

Se colocó  
al macho  
↓

N° animal

1	E	PE	PE	E	D	P	E	D	D	D	DE	E	D	P
2	D	DP	P	E	D	DP	P	E	D	DP	P	E	D	P
3	D	DP	P	E	D	DP	P	E	D	D	P	E	D	P
4	D	P	E	D	D	DP	P	D	DP	PE	E	DP	DP	P
5		D	P	E	D	DP	P	E	D	DP	P	E	D	DP
6	E	DP	DP	PE	E	E	D	PE	E	DP	DP	P	E	P
7	DP	DP	PE	D	D	P	E	E	D	DP	DP	DP	DP	P

En sombreado se presentan los frotis de las hembras con ciclos regulares.

A este grupo de animales se les colocó por primera vez con un macho de fertilidad comprobada, al observar los espermatozoides en el frotis vaginal se retiró al macho y se continuó la toma de frotis por aproximadamente 12 días, durante los cuales se observó que sólo una de ellas continuó con el patrón de ciclo estral. En estos animales a pesar de haberse observado espermatozoides sólo dos parieron al llegar al final de la gestación (Tabla 17).

**Tabla 17.** Ciclos vaginales tomados a ratas adultas que fueron tratadas a los tres días de vida con Capsaicina y que presentaron espermatozoides después de ser colocadas con el macho de fertilidad comprobada.

Presencia  
de espermatozoides

N°  
animal ↓

1	E	DP	D	D	DP	DP	D	D	D	DP	DP	D			
2	E	D	DP	PE	E	D	E	P	DP	E	P	E	P	DE	
3	E	E	ED	DP	PE	DP	PE	DP	P	DP	DP	DP			
4	E	E	DP	DE	P	E	DP	D	P	DP	DP	DP			
5	E	D	D	P	E	D	DP	P	E	DP					
6	E	DP	D	DP	D	DE	DE	D	D	D	DE	D	D	DP	DP
7	E	E	DP	D	DE	DE	PE	DP	D	D	D	DP	D	D	

En sombreado se presentan los frotis de las hembras con ciclos regulares.

En círculo se presentan las hembras que parieron.

**Experimento 7. Efecto de la denervación sensorial, inducida por la administración de capsaicina al nacimiento o a los tres días de edad, en la tasa de fertilidad.**

***Animales denervados al nacimiento.***

Para analizar si en las hembras la administración con vehículo al nacimiento modificó su capacidad reproductiva, éstas se colocaron con machos testigo de fertilidad comprobada y se compararon con los resultados obtenidos al realizar la cruce con hembras intactas.

El 86% de las hembras inyectadas con el vehículo quedaron preñadas en la primera oportunidad que fueron colocadas con el macho, semejante a lo observado con los animales intactos (87%). Dado que no hubo diferencias significativas entre estos dos lotes de animales, se agruparon y en adelante lo llamaremos grupo testigo.

Un grupo de hembras denervadas al nacimiento fueron colocadas, por primera vez, en el día del proestro con un macho de fertilidad comprobada, todas mostraron al día siguiente la presencia de espermatozoides en el frotis vaginal, sin embargo sólo el 13% de estas hembras quedó preñada. La duración de la preñez en días, así como el número de crías nacidas vivas fue normal. A las hembras no preñadas se les colocó por segunda ocasión con el macho, el 92 % de ellas presentaron espermatozoides y sólo una llegó a parir (Tabla 18).

**Tabla 18.** Prueba de fertilidad en ratas denervadas por la administración de capsaicina al nacimiento.

<b>CRUZAS</b>	<b>♀ vs ♂</b>	<b>♀ con espermas</b>	<b>♀ que parieron</b>	<b>Media ± sem del número de Crías nacidas</b>	<b>Preñez en días</b>
<b><i>Primera oportunidad</i></b>					
<b>hembra testigo/macho testigo</b>	22 7	22/22	19/22	9.7±2.6	23±2
<b>hembra capsaicina/macho testigo</b>	15 3	15/15	2/15*	7.0±3.0	21±3
<b><i>Segunda oportunidad</i></b>					
<b>hembra testigo/macho testigo</b>	3 1	3/3	3/3	9.7±2.6	23±2
<b>hembra capsaicina/macho testigo</b>	12 4	11/12	1/12*	6	23±0

\*p<0.05 vs hembras testigo (Prueba de Ji<sup>2</sup>).

***Ratas adultas denervadas a las 72 horas de nacidas.***

Como en el caso de las ratas denervadas al nacimiento, el 86% de las hembras adultas inyectadas a los tres días de vida con vehículo quedaron preñadas al ser colocadas con el macho de fertilidad comprobada, lo cual fue igual a lo que sucedió con los animales intactos (87%). Por lo que los dos lotes se unieron para formar el grupo testigo.

En el caso de las hembras denervadas y colocadas en el día del proestro, por primera vez con el macho testigo, al día siguiente el 100% presentaron espermatozoides en el frotis vaginal y solo el 13% llegó a parir. En el segundo intento de las hembras que no quedaron preñadas todas presentaron espermas y sólo el 29% llegó a parir (Tabla 19). La duración de la preñez en días, así como el número de crías nacidas vivas fue normal.

Tabla 19. Prueba de fertilidad en ratas denervadas por la administración de capsaicina a los tres días de vida.

CRUZAS	♀Vs♂	♀ con espermas	♀ que parieron	Media ± eem del número de Crías nacidas	Preñez en días
<b>Primera oportunidad</b>					
hembra testigo/macho testigo	22 7	22/22	19/22	9.7±2.6	23 ±3
hembra capsaicina/macho testigo	8 3	8/8	1/8*	9	23 ±0
<b>Segunda oportunidad</b>					
hembra testigo/macho testigo	3 1	3/3	3/3	9.7±2.6	23 ±2
hembra capsaicina/macho testigo	7 2	7/7	2/7*	9±1	23 ±2

\*p<0.05 vs hembras testigo (Prueba de Ji<sup>2</sup>).

## DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en el presente estudio muestran que la eliminación de la información sensorial a los tres días de edad, inducida por la administración de capsaicina, no modifica el inicio de la pubertad aún cuando disminuye la esteroidogénesis del ovario, y modula de manera estimulante los mecanismos neuroendócrinos que participan en la diferenciación de los folículos ováricos.

En el presente estudio se observó que la administración de capsaicina en la etapa neonatal produce algunas alteraciones fenotípicas tales como cambios en la textura del pelaje, de la piel y en el brillo de los ojos. Es bien conocido que los órganos de los sentidos reciben inervación sensorial (Brown, 1994) a través del nervio trigémino, el cual presenta tres principales ramificaciones que proporcionan inervación a nivel de la nariz, frente, mandíbula, cuero cabelludo y ojos. Aunado a esto, Gamse y colaboradores (1981) mostraron que este nervio contiene SP-I, dicho péptido es característico de las fibras sensibles a capsaicina. Estas evidencias nos permiten suponer que en los animales denervados se modificaron las fibras sensitivas que inervan los ojos y los conductos pilosos, hecho que se traduce en un menor brillo de los ojos y una textura del pelaje más gruesa y erizada, comparada con la de los animales testigo, semejante a lo observado por Carrillo y colaboradores (1994).

Se ha mostrado que la administración al nacimiento (día cero) de capsaicina provoca lesiones en la piel, que empiezan a observarse a partir de los 19 días de edad; éstas se presentan como úlceras y son más frecuentes a nivel de cuello, cabeza y hombros (Carrillo y col., 1994). En nuestro estudio las lesiones que se observaron empiezan a ser visibles después del destete (21 días de edad) y son más severas cuando el animal llega a la etapa adulta. Maggi y colaboradores (1987a), señalan que los nervios sensitivos a la capsaicina juegan un papel trófico en el mantenimiento e integridad de la piel. La eliminación de este mecanismo neurogénico hace que la piel disminuya su capacidad de reaccionar y repararse en respuesta a daños. Debido a que en el animal denervado la nocicepción disminuye (la respuesta a estímulos físicos), el comportamiento normal de acicalamiento es más

más intenso que en el testigo, lo cual produce un microtrauma en la piel. Otras evidencias confirman que a nivel cutáneo, la liberación de neurotransmisores por los nervios sensoriales determinan la vasodilatación (Lembeck y Holzer, 1981; Lembeck y Donnerer, 1979) y el incremento en la permeabilidad vascular característica de la inflamación neurogénica (Jancsó y col., 1968).

La denervación sensorial realizada a los tres días de edad provoca un enlentecimiento en la tasa de crecimiento corporal, que se hace manifiesto desde la tercera semana de edad y se mantiene hasta la quinta semana. Morán y col. (1998) señalan que la administración de capsaicina al nacimiento (días cero) provoca una disminución del peso corporal, que se presenta previo a la edad en que se produce la canalización de la vagina para después normalizarse. Resultados semejantes se observan cuando la denervación se realiza al día dos de vida (Carrillo y col., 1994). Mientras que hay trabajos que muestran que la administración de la capsaicina al día uno de vida provoca disminución del peso, que se observa desde los catorce días de edad y se mantiene hasta los 95, siendo más marcada cuando el animal alcanza la pubertad (Traurig y col., 1984a). Al parecer, el efecto de la denervación sobre el crecimiento de la masa corporal va a depender de la edad en la que se realiza la administración del fármaco y probablemente de la cepa del animal. Los mecanismos implicados en la pérdida de peso corporal aún no son bien conocidos, aunque existen algunas alternativas que pueden ayudarnos a explicar dicha respuesta.

Carrillo y col., (1994) mostraron que la denervación sensorial está asociada con una variedad de efectos conductuales como disminución en la frecuencia de olfateo. Ha sido mostrado que la desensibilización por capsaicina no modifica la respuesta olfatoria, aún cuando se reduce severamente e incluso se llega a eliminar la respuesta a olores por el nervio trigémino nasal. Estos resultados les ha permitido sugerir a los autores que la capsaicina causa algunos daños en la sensibilidad del nervio, lo que apoya el hecho de que el efecto sería a nivel periférico (Silver y col., 1985; Cormareche-Leydier y Vernet-Maury, 1989). Con nuestros resultados no podemos descartar que la disminución del peso corporal, observado a partir de la

tercera semana de vida, se deba a modificaciones del sistema olfativo. Es probable que en estos animales disminuya su capacidad para localizar el alimento y se acentúe después del destete.

Lembeck y Amann (1986) mostraron que en ratas pretratadas con capsaicina no se presenta el incremento en la concentración de ACTH después de someterlas a un estrés por frío por lo que podemos descartar que la disminución en el peso se deba a un mayor estrés inducido por la denervación sensorial.

La información sensorial no sólo está implicada en funciones emocionales y conductuales. Al parecer, este sistema de información neural modula algunos de los eventos relacionados con el aparato reproductor. La aplicación de capsaicina a ratas recién nacidas (Morán y col., 1998, 2000b) provoca un retraso en el inicio de la pubertad, resultados semejantes a los que se obtienen cuando la denervación se realiza al día dos de vida (Traurig y col., 1984a). Los autores han explicado que este retraso es debido al lento desarrollo de los animales, reflejado en la disminución de su peso corporal, ya que el inicio de la pubertad se ha asociado con procesos metabólicos involucrados con el peso y talla del animal (Frisch, 1980; Steiner y col., 1983). En el presente estudio aún cuando la administración de capsaicina a los tres días de edad provocó disminución en el peso corporal en la etapa cercana a la pubertad, la edad de la canalización vaginal no se modificó, aún cuando disminuyó la concentración plasmática de estradiol. Estos resultados nos permiten sugerir que la cantidad de estrógenos sintetizados fue suficiente para estimular los receptores de la vagina y provocar su canalización, o bien, que aumentó la sensibilidad del tejido de la vagina a estas hormonas.

Dissen y Ojeda (1999) mencionan que la inervación sensorial, representada por las fibras que contienen sustancia P y el CGRP, no participa en la esteroidogénesis ovárica, más bien se le ha asociado con la regulación del flujo sanguíneo. En nuestro estudio observamos que la síntesis de estrógenos disminuyó al primer estro vaginal, lo que podría deberse a la caída en el número de folículos sanos, aunque se requiere de estudios adicionales para corroborar esta hipótesis.

En la rata el proceso de foliculogénesis se lleva a cabo durante las primeras 48 horas de vida, y se ha postulado que este proceso es regulado por mecanismos neurales (Malamed y col., 1992; Ojeda 1997; Dissen y Ojeda 1999) y no tanto por el ambiente hormonal, ya que se sabe que en el ovario los receptores a gonadotropinas recién se pueden encontrar a partir del día cuatro de vida (Ojeda y Urbanski, 1994). La denervación sensorial en ratas recién nacidas disminuye el número total de folículos, estos resultados han sido interpretados por Morán y colaboradores (1998), como que la falta de información neural que se genera en el ovario y que es llevada al Sistema Nervioso Central, modifica la respuesta del folículo a las gonadotropinas. En el presente estudio la denervación se realizó al tercer día de vida, después de haberse dado la foliculogénesis y no se observó cambios en el número total de folículos. Esto podría indicar que una vez culminada la foliculogénesis, la información sensorial ya no es fundamental en el establecimiento del número de folículos que van a iniciar su crecimiento.

Se han sumado las evidencias que muestran que puede haber una interrelación funcional entre la inervación simpática y la sensorial para regular el crecimiento de los folículos que van a culminar con la ovulación (Ojeda, 1997; Ojeda y Urbanski, 1994). Lara y col., (1990a) administraron anticuerpos al factor de crecimiento neural (abNGF) y promovieron con esto la destrucción de fibras simpáticas y sensoriales, que resultó en un aumento del número total de folículos, dado por los preantrales, mientras que la sola eliminación de las fibras simpáticas, inducida por la aplicación de guanetidina, provoca una disminución en el número total de folículos Lara y col. (1990b). Con estos resultados los autores proponen que la información que viaja por las fibras sensoriales facilita la comunicación intrafolicular. En nuestra cepa de animales aunque la administración de capsaicina a los tres días de edad no modificó el número total de folículos, si se observó disminución en el número de folículos sanos menores de 349 $\mu$ m de diámetro, hecho que podría indicar que la inervación sensorial está vinculada más con los procesos de diferenciación del folículo ovárico. Esta interpretación se apoya en la hipótesis planteada por Dissen y Ojeda (1999), quienes sugieren que la información que se

genera a nivel del ovario es llevada al SNC para "informar" sobre el estado funcional del folículo.

Existen trabajos que muestran que algunos órganos que reciben inervación simpática, responden ante la denervación sensorial con un aumento en el contenido de sus neurotransmisores (Luthman y col., 1989). En el caso de los ovarios, la administración de capsaicina provocó aumento significativo del contenido de noradrenalina y dopamina, comparado con el grupo testigo. Al momento no tenemos una explicación sobre la importancia fisiológica que pudiera tener el incremento de catecolaminas ováricas. Sin embargo, es un evento que se esperaba ya que se ha reportado que ante la dervación sensorial los órganos con una rica inervación simpática presentan aumento de la concentración de noradrenalina(Luthman y col, 1989).

En el presente estudio se observó que en la rata la falta de información sensorial, inducida por la administración de capsaicina a las 72 horas de vida, ocasiona alteraciones en el patrón del ciclo estral en el animal púber, que se traducen en un alargamiento de la etapa de diestro. Resultados semejantes han sido mostrados por Lara y colaboradores (1990a) quienes al administrar el anticuerpo al factor de crecimiento observaron que se alarga la etapa de diestro y que tardan aproximadamente seis días, después de la apertura vaginal, en presentar el estro. Es posible que la persistencia del diestro vaginal sea el reflejo de cambios en la secreción de la prolactina, ya que se ha descrito que el aumento de esta hormona induce que se extienda la fase de diestro (Ojeda y Urbanski, 1994). Esta interpretación se ve apoyada por el hecho de que el Sistema Nervioso Central recibe inervación sensorial que puede modular la secreción de los factores liberadores del hipotálamo y con ello de las hormonas hipofisarias (Louis y col., 1978).

La vagina y el cervix son inervados por fibras sensoriales las cuales juegan un papel muy importante en el reflejo neuroendócrino de la cópula (Gu y col., 1983; Traurig y col., 1983; Nance y col., 1987). Debido a que en la rata la estimulación mecánica del cervix o durante la cópula induce la liberación de LH y PRL hipofisaria,

la secreción de estas hormonas luteotrópicas rescata al cuerpo lúteo de la atrofia y facilita la secreción de progesterona necesaria para la implantación del blastocisto, el mantenimiento de la preñez o de la pseudopreñez (MacDonald y Greep, 1970; Morischige y Rothchild, 1974; Smith y col., 1975; Traurig y col., 1984 a, b). En el presente estudio se observó que de las hembras denervadas, al nacimiento o a las 72 horas, sólo el 13% de ellas quedaron preñadas, por lo que aún cuando la denervación se realizó a diferentes edades, se observó una marcada disminución sobre la incidencia de preñez. Resultados semejantes han sido mostrados por el grupo de Nance (1987), quienes administraron capsaicina en animales adultos y observaron disminución en la tasa de fertilidad. En nuestro estudio, la disminución en la fertilidad puede ser atribuida a la baja concentración de progesterona que se observó al primer estro vaginal, hecho que podría alterar la función del endometrio para permitir la implantación del huevo, aún cuando no se observaron diferencias en el peso del útero. Al momento, desconocemos si el problema se puede presentar no sólo a nivel del útero, sino también en los mecanismos implicados en la fertilización del ovocito e incluso en su viabilidad.

La denervación sensorial por la administración de capsaicina al nacimiento o a los tres días de vida induce disminución en la población de folículos sanos al primer estro vaginal, por lo que es probable que al llegar a la etapa adulta el número de óvulos viables sea menor. No se puede descartar que la disminución en la fertilidad este dada también por alteraciones en la respuesta de lordosis, tal y como lo postulan algunos autores (Nance y col., 1987; Carrillo y col., 1994).

El tratamiento con capsaicina al nacimiento provoca depleción de sustancia P y de somatostatina en neuronas sensoriales presentes en la raíz ventral, ganglio de la raíz dorsal, en la córnea y en el ganglio trigémino. Por otra parte, existen estudios *in vitro* en los que el hipotálamo y la sustancia nigra de animales denervados no liberan al medio sustancia P, efectos similares se observan cuando el fármaco se administra a nivel ventricular, por lo que los autores sugieren que la capsaicina puede atravesar la barrera hematoencefálica, pero no ejercer efecto sobre esas estructuras (Gamse y col., 1979, 1981). Sin embargo, Comareche-Leydier y col.

(1985) indican que la capsaicina causa daños a nivel de los receptores hipotérmicos localizados en el área preóptica del hipotálamo. En nuestro estudio observamos que la administración de capsaicina a ratas de tres días de edad, no alteró la función del hipotálamo evaluado por la concentración de gonadotropinas (FSH y LH), así como de las catecolaminas y de serotonina.

Existen evidencias experimentales que muestran que dentro del hipotálamo existen poblaciones celulares que son sensibles a la capsaicina, tal es el caso del los termorreceptores que se localizan a nivel del área preóptica (Comareche-Leydier y col. 1985). En la rata la administración de capsaicina puede activar la pérdida de calor causando hipotermia, lo que ocasiona que del 20 al 50% de los animales tratados mueran en un lapso de 24 horas. Siendo los animales jóvenes más tolerantes a altas dosis de capsaicina que los de edad más avanzada (Cabanac y col., 1976; Szikszay y col., 1982; Szolcsányi y Jancsó-Gábor 1972). Gamse y col. (1981), observaron que la administración de capsaicina en una dosis de 50 mg/kg de pc a ratas neonatas causa que el 50% de los animales mueran dentro de las 3-5 semanas posteriores al tratamiento, mientras que cuando la administración se realiza en la etapa adulta del 10 al 80% de los animales mueren el mismo día o al día siguiente de la administración del fármaco. En el presente trabajo se observó que en los animales denervados al tercer día de vida se presentó un 62% de mortandad durante las primeras dos semanas de vida, semejante a lo que se observa cuando la denervación se realizó al nacimiento (57%). Es posible que la mortandad de nuestros animales también se deba a una disminución en la temperatura corporal, la cual observamos que se produce de manera drástica minutos después de haberse inyectado el fármaco.

## CONCLUSIONES

- La denervación sensorial realizada a los tres días de edad no modifica el inicio de la pubertad (evaluado por la edad de la canalización vaginal) ni la primera ovulación espontánea.
- La eliminación de la información sensorial a los tres días de edad no modifica el total de folículos.
- La inervación sensorial que se genera en el ovario "informa" al Sistema Nervioso Central sobre el desarrollo y estado funcional de los folículos, ya que la denervación sensorial, a los tres días de vida, disminuye el número de folículos sanos.
- La denervación sensorial no modifica la actividad del hipotálamo, evaluada por la concentración plasmática de gonadotropinas y de aminas e indolaminas hipotalámicas.
- La inervación sensorial modula de manera inhibitoria al sistema simpático, dado que la administración de capsaicina provoca un incremento del contenido de catecolaminas ováricas.
- La inervación sensorial modula de manera estimulante la esteroidogénesis ovárica.
- La inervación sensorial participa en el establecimiento del patrón del ciclo estral, ya que en los animales denervados se presentó un alto porcentaje de animales acíclicos.
- La información sensorial participa de manera estimulante en los mecanismos que conllevan a la preñez puesto que en los animales denervados disminuyó significativamente su capacidad reproductiva.

**BIBLIOGRAFIA:**

- Aberdeen L., Corr L., Milner P., Lincoln J. y Burnstock G. 1990. Marked increases in calcitonin gene-related peptide-containing nerves in the developing rat following long-term sympathectomy with guanethidine. *Neuroscience*. 35: 175-184.
- Ahmed C. E., Dees W. L. y Ojeda S. R. 1986. The immature rat ovary is innervated by vasoactive intestinal peptide (VIP). Containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology*. 118:1682-1689.
- Arvidsson J. y Ygge J. 1986. A quantitative study of the effects of neonatal capsaicin treatment and of subsequent peripheral nerve transection in the adult rat. *Brain Res*. 397:130-136.
- Barr M. L. y Kiernan J. A. 1986. Nervios craneales. En: *El sistema nervioso humano*. Edit. Harla. México. 142-147
- Betanzos R. y Morales L. 1997. En la rata el nervio vago participa en los procesos neuroendocrinos que culminan con el inicio de la pubertad. *XL Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*, Morelia, Michoacán.
- Betanzos R., Morales L. y Chavira R. 1998. En la rata hembra prepúber el nervio vago estimula la esteroidogénesis. *XLI Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas*, San Luis Potosí, San Luis Potosí.
- Bittner M. A. y LaHann T. R. 1985. Biphasic time-course of capsaicin-induced substance P depletion: failure to correlate with thermal analgesia in the rat. *Brain Res*. 322:305-309.
- Bleakman D., Brorson J. R. y Miller R. J. 1990. The effect of capsaicin on voltage-gated calcium currents and calcium signals in cultured dorsal root ganglion cells. *Br. J. Pharmacol*. 101:423-431.
- Bleier R., Cohn P. y Siggelkow R. 1979. A cytoarchitecture atlas of the hypothalamus and hypothalamic third ventricle of the rat. En: *Anatomy of the hypothalamus*. P. Morgane y J. Panksepp (Eds), Vol. I, Marcel Dekker Inc., New York. 137-220.
- Brown R. E. 1994. Divisions of nervous system. En: *An introduction to neuroendocrinology*. Brown, R. E. (Ed). Cambridge university press. New York. 78-83.
- Burden H .W. 1978. Ovarian innervation. En: *The vertebrate ovary: comparative biology*. Jones, R.E. (Ed). Plenum Press. New York, Capítulo 18. 616-638.

- Burden H. W., Lawrence I. E., Louis T. M. y Hodson C. A. 1981. Effects of abdominal vagotomy on the estrous cycle of abdominal vagotomy on the estrous cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy. *Neuroendocrinology*. 33:218-222.
- Burden H. W., Leonard M., Smith C. P. y Lawrence I. E. 1983. The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. *The Anatomical Record*. 207:623-627.
- Burks T., Buck S. y Miller M. 1985. Mechanisms of depletion of substance P by capsaicin. *Federation Proceeding*. 44:2531-2534.
- Byskov A. G. y Hoyer P. E. 1994. Embryology of mammalian gonads and ducts. En: *The Physiology of Reproduction*. Knobil E. y Neil J. D. (Eds) Raven Press. New York, Capitulo 9. 499-505.
- Cabac M., Cormareche-Leydier M. y Poirier L. J. 1976. The effect of capsaicin on temperature regulation of the rat. *Pflugers Arch*. 366:217-221.
- Calka J. A., McDonald J. K. y Ojeda S. R. 1988. The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biology of Reproduction*. 39:1215-1223.
- Carrillo P., Manz J., Martinez-Gomez M., Salas M. y Pacheco P. 1994. Neonatal capsaicin administration: effects on behavioral development of the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 48(2):447-452.
- Chahl L. A. 1988. Antidromic vasodilatation and neurogenic inflammation. *Pharmacol. Ther*. 37:275-300.
- Chávez R. Carrizosa L. y Domínguez R. 1991. Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rat. *Medical Science Research*. 19:41-42.
- Chávez R., Cruz E. y Domínguez R. 1987. Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in the unilaterally ovariectomized rats: effect of is-and contralaterally vagus nerves on the remaining ovary. *Journal of Endocrinology*. 113:397-401.
- Chávez R., Sánchez S., Ulloa-Aguirre A. y Domínguez R. 1989. Effects on oestrous cyclicity and ovulation of unilateral section of the vagus nerve performed on different day of the oestrous cycle in the rat. *Journal of Endocrinology*. 123:441-444.
- Comareche-Leydier M. y Vernet-Maury E. 1989. the effects of capsaicin on emotional responses to odors in the rat. *Physiology and Behavior*. 46:679-684.
- Comareche-Leydier M. Shimada S. G. y Stitt J. T. 1985. Hypotalamic termosensitivity in capsaicin-desensitized rats. *J. Physiol*. 363:227-236.

- Dees W. L., Ahmed C. E. y Ojeda S. R. 1986. Substance P-and Vasoactive intestinal peptide-containing febers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology*. 119:638-641.
- Dees W. L., Kozlowski G. P., Dey R. y Ojeda S. R. 1985. Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. II. Immunocytochemical localization. *Biology of Reproduction*. 33:471-476.
- Diez Guerra F. J., Zaidi M., Bevis P., MacIntyre I. y Emson P. C. 1988. Evidence for release of calcitonin gene-related peptide and neurokinin A from sensory nerve endings *in vivo*. *Neuroscience*. 25:839-846.
- Dissen G. A. y Ojeda S. R. 1999. Ovarian Innervation En: *Encyclopedia of Reproduction*. Knobil E. y Neil J. D. (Eds). Academic Press, USA. 583-589.
- Docherty R. J., Robertson B. y Bevan S. 1991. Capsaicin causes prolonged inhibition of voltage-activated calcium currents in adult rat root ganglion neurons in culture. *Neuroscience*. 40:513-521.
- Dodd J. y Role L. W. 1991. The autonomic nervous system. En: *Principles of Neural Science*. E. R. Kandel, J. H. Schwartz, y T. H. Jessell (Eds). 761-775
- Dohler K. D. y Wuttke W. 1974. Serum LH, FSH, prolactin and progesterone from birth to puberty in female and male rats. *Endocrinology*. 94:1003-1008.
- Domínguez R., Chávez R. y Cruz M. E. 1991. La regulación del crecimiento y el desarrollo folicular. En: *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. R. Domínguez (PORRUA). Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, U.N.A.M., México. 163-188.
- Donnerer J., Eglezos A. y Helme R. D. 1990. Neuroendocrine and immune function in the capsaicin-treated rat: evidence for afferent neural modulation *in vivo*. En: *The Neuroendocrine-Immune Network*, S. Freier (Ed), CRC Press, Boca Raton, FL. 69-83
- Dray A., Forbes C. A., y Burgess G. M. 1990. Ruthenium red blocks the capsaicin-induced increase in intracellular calcium and activation of membrane currents in sensory neurones as well as the activation of peripheral nociceptors *in vitro*. *Neurosci. Lett*. 110:52-59.
- Fawcett M. D. (1995). Sistema reproductor femenino. En: *Tratado de histología*. Ed. Interamericana-McGraw-Hill. España. 885-904.
- Frisch R. 1980. Pubertal adipose tissue: Is it necessary for normal sexual maturation? Evidence from the rat and human female. *Fed. Proc*. 39:2395-2400.
- Gamse R., Molnar A. y Lembeck F. 1979. Sustance P releasase from spinal cord slices by capsaicin. *Life Sci*. 25:629-636.

- Gamse R. 1982. Capsaicin and nociception in the rat and mouse. Possible role of substance P. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 320:205-216.
- Gamse R., Holzer P. y Lembeck F. 1980. Decrease of substance P in primary sensory neurones and impairment of neurogenic plasma extravasation by capsaicin. *Br. J. Pharmacol.* 68:207-213.
- Gamse R., Leeman S. E., Holzer P. y Lembeck F. 1981. Differential effects of capsaicin on the content of somatostatin, substance P. and neurotensin in the nervous system of the rat. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 317:140-148.
- Gamse R., Petsche U., Lembeck F., y Jancsó G. 1982. Capsaicin applied to peripheral nerve inhibits axoplasmic transport of substance P and somatostatin. *Brain Res.* 239:447-462.
- Gardiner S. M., Bennett T. y O'Neill T. P. 1989. Synthetic capsaicin reversibly impairs vasopressin-mediated blood pressure recovery. *Am. J. Physiol.* 257:R1423-R1435.
- Gerendai I. y Halász B. 1997. Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinology.* 18: 354-381.
- Gu J., Huang W., Islam K., McGregor G., Terenghi G., Morrison J., Bloom S. y polak J. 1983. Substance P-containing nerves in the mammalian genitalia. En: *Substance P*. Skrabanek, P., Powell, D. (Eds). Boole Press Ltd, Dublin. 263-264.
- Hage A. J., Groen-klevant A. C. y Welschen R. 1978. Follicle growth in the immature rat ovary. *Acta Endocr.* 88:375-382.
- Hammond D. L. y Ruda M. A. 1989. Developmental alterations in thermal nociceptive threshold and the distribution of immunoreactive calcitonin gene-related peptide and substance P after neonatal administration of capsaicin in the rat. *Neurosci. Lett.* 97:57-62.
- Holje H., Hildebrand C. y Fried K. 1983. Proportion of unmyelinated axons in the rat inferior alveolar nerve and mandibular molar pulps after neonatal administration of capsaicin. *Brain Res.* 266:133-136.
- Holzer P. 1988. Local effector functions of capsaicin-sensitive sensory nerve endings: involvement of tachykinins, calcitonin gene-related peptide and other neuropeptides. *Neuroscience.* 24:739-768.
- Holzer P. y Sametz W. 1986. Gastric mucosal protection against ulcerogenic factors in the rat mediated by capsaicin-sensitive afferent neurons. *Gastroenterology.* 91: 975-981.
- Holzer P. 1991. Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews.* 43(2): 144-189.

- Hsueh A. J., Billig H. y Tsafriri A. 1994. Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Review*. 15(6):707-724.
- Jancsó G. 1960. Role of the nerve terminals in the mechanism of inflammatory reactions. *Bull. Millard Fillmore Hosp.* 7: 53-77.
- Jancsó G. y Király E. 1981. Sensory neurotoxins: chemically induced selective destruction of primary sensory neurons. *Brain Research*. 210:83-89.
- Jancsó G., Király E. y Jancsó-Gábor A. 1977. Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature*. 270:741-743.
- Jancsó G., Király E. y Jancsó-Gábor A. 1980. Chemosensitive pain fibres and inflammation. *Int. J. Tissue React.* 2:57-66.
- Jancsó G., Király E., Joó F., Such G. y Nagy A. 1985. Selective degeneration by capsaicin of a subpopulation of primary sensory neurons in the adult rat. *Neurosci. Lett.* 59:209-214.
- Jancsó G., Király E., Such G., Joó F. y Nagy A. 1987. Neurotoxic effect of capsaicin in mammals. *Acta Physiol. Hung.* 69:295-313.
- Jancsó N., Jancsó-Gábor A. y Szolcsányi J. 1968. The role of sensory nerve endings in neurogenic inflammation induced in the human skin and in the eye and paw of the rat. *Br. Pharmacol.* 32:32-41.
- Jessell T., Tsunoo A., Kanazawa I. y Otsuka M. 1978. Substance P: Depletion in the dorsal horn of rat spinal cord after section of the peripheral processes of primary sensory neurons. *Brain Res.* 168:247-260.
- Kamakura K., Ishiura S., Sugita H. y Toyokura I. 1983. Identification of Ca<sup>2+</sup>-activated neutral protease in the peripheral nerve and its effect on neurofilament degeneration. *J. Neurochem.* 40:908-913.
- Kjartansson J., Dalsgaard C. J. y Jonsson C. E. 1987. Decreased survival of experimental critical flaps in rats after sensory denervation with capsaicin. *Plast. Reconstr. Surg.* 79:218-221.
- Klein C. M. y Burden H. W. 1988. Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters*. 85:217-222.
- Lara H. E., Mc Donald J. K. y Ojeda S. R. 1990a. Involvement of nerve growth factor in female sexual development. *Endocrinol.* 126:364-375.
- Lara H. E., Mc Donald J. K., Ahmed C. E. y Ojeda S. R. 1990b. Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. *Endocrinol.* 127:2199-2209

- Lawrence I. E. y Burden H. W. 1978. Role of peripheral parasympathetic nerves in pregnancy and parturition. *Journal of Endocrinology*. 49:40-41 pp.
- Lawrence I. E. y Burden H. W. 1980. The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record*. 196:51-59.
- Lawrence I. E., Burden H. W. y Louis T. M. 1978. Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentrations and fetal resorption. *J. Reproduction and Fertility*. 53:131-136.
- Lawson S. N. y Nickels S. M. 1980. The use of morphometric techniques to analyse the effects of neonatal capsaicin treatment on rat dorsal root ganglia and dorsal roots. *J. Physiol. (Lond.)*. 303:12P.
- Lembeck F. y Amann R. 1986. The influence of capsaicin sensitive neurons on stress-induced release of ACTH. *Brain Res. Bull.* 16:541-543.
- Lembeck F. y Donnerer J. 1979. Postocclusive cutaneous vasodilatation mediated by substance P. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 316:165-171.
- Lembeck F. y Donnerer J. 1981. Time course of capsaicin-induced functional impairments in comparison with changes in neuronal substance P content. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 316:240-243.
- Lembeck F. y Holzer P. 1981. Substance P as neurogenic mediator of antidromic vasodilatation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol.* 310:175-183.
- Louis T. M., Lawrence I. E., Becker R. F. y Burden H. W. 1978. Prostaglandin F<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub>, progesterone, 20 $\alpha$ -dihydroprogesterone and ovarian 20 $\alpha$  hydroxysteroid dehydrogenase activity in preparturient pelvic neurectomized rats. *Proc Soc Exp Biol Med.* 158:631-636.
- Luthman J., Stromberg I. Brodin E. y Jonsson G. 1989. Capsaicin treatment to developing rats induces increase of noradrenaline levels in the iris without affecting the adrenergic terminal density. *Int. J. Dev. Neurosci.* 7:613-620.
- MacDonald G. J. y Greep R. O. 1970. Inability of LH administered in a delay vehicle to maintain luteal function. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 134:936-937.
- Maggi C. A., Borsini F., Santicioli P., Geppetti P., Abelli L., Evangelista S., Manzini S., Theodorsson-Norheim E., Somma V., Amenta F., Bacciarelli C. y Melli A. 1987a. Cutaneous lesions in capsaicin-pretreated rats. A trophic role of capsaicin-sensitive afferents? *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 336:538-545.
- Maggi C. A., Lippe I. Th., Giuliani S., Abelli L., Somma V., Gepetti P., Jancsó G., Santicioli P. y Meli A. 1989. Topical versus systemic capsaicin

desensitization: specific and unspecific effects as indicated by modification of reflex micturition in rats. *Neuroscience*. 31:745-756.

- Maggi C. A. y Meli A. 1988. The sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Gen. Pharmacol.* 19:1-43.
- Maggi C. A., Santicioli P., Geppetti P., Furio M., Frilli S., Conte B., Fanciullacci M., Giuliani S. y Mel A. 1987b. The contribution of capsaicin-sensitive innervation to activation of the spinal vesicovesical reflex in rats: relationship between substance P levels in the urinary bladder and the sensory-efferent function of capsaicin-sensitive sensory neurons. *Brain Res.* 415:1-13.
- Maggi C. A., Santicioli P., Geppetti P., Giuliani S., Patacchini R., Frilli S., Grassi J. y Meli A. 1987c. Involvement of a peripheral site of action in the early phase of neuropeptide depletion following capsaicin desensitization. *Brain Res.* 436:402-406.
- Malamed S., Gibney J. A. y Ojeda S. R. 1992. Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. *Cell Tissue Research.* 270:87-93.
- Mathews D., Andrews W. W., Parker R. Jr. y Ojeda S. R. 1987. A role for aromatizable androgens in female puberty. *Biol. Reprod.* 36:836-843.
- Merchant H. L. 1991. Gametogénesis. En: *Tópicos selectos de biología de la reproducción*. Domínguez, R. (coordinador). Universidad nacional autónoma de México. Coordinación de la investigación científica programa universitario de investigación en salud. 11-29.
- Morales L., Chávez R., Ayala M. y Domínguez R. 1998. Effects of the unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats, on the ovulatory response to gonadotrophins administration. *Journal of Endocrinology*. En Prensa.
- Morales L., Chávez R. y Domínguez R. 1993. Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of ovulation in the prepubertal rat: differential effects of unilateral and bilateral section of the nerve. *Medical Science Research.* 21:15-17.
- Morán C. 1996. Modificaciones en el crecimiento y diferenciación del folículo en el ovario de la rata juvenil inducidas por la sección unilateral o bilateral del nervio ovarico superior. *Tesis de licenciatura*. Facultad de Estudios Superiores Zaragoza. UNAM.
- Morán C., Morales L., Quiróz U. y Domínguez R. 1998. Efectos de la denervación sensorial sobre la pubertad de la rata hembra. *XXIII Reunion anual, Academia de Investigación en Biología de la Reproducción*. 96-104.

- Morán C., Morales L., Quiróz U. y Domínguez R. 2000a. Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rat on the follicular growth. *Journal of Endocrinology*. 166: 205-211.
- Morán C., Razo R., Morales L. y Domínguez R. 2000b. Efectos de la denervación sensorial sobre la pubertad. *XXV Reunion anual, Academia de Investigación en Biología de la Reproducción*. 157-161.
- Morischige W. K. y Rothchild I. 1974. Temporal aspects of the regulation of corpus luteum function by luteinizing hormone, prolactin and placental luteotropin during the first half of pregnancy in the rat. *Endocrinology*. 95:260-274.
- Nagy J. I. y Hunt S. P. 1983. The termination of primary afferents within the rat dorsal horn: evidence for rearrangement following capsaicin treatment. *J. Comp. Neurol*. 218:145-158.
- Nagy J. I., Vincent S. R., Staines Wm. A., Fibiger H. C., Reisine T. D. y Yamamura H. I. 1980. Neurotoxic action of capsaicin on spinal substance P neurons. *Brain Research*. 186:435-444.
- Nagy J. I., Hunt S. P., Iversen L. L. y Emson P. C. 1981. Biochemical and anatomical observations on the degeneration of peptide-containing primary afferent neurons after neonatal capsaicin. *Neuroscience* 6:1923-1934.
- Nagy J. I., Iversen L. L., Goedert M., Chapman D. y Hunt S. P. 1983. Dose-dependent effects of capsaicin on primary sensory neurons in the neonatal rat. *J. Neurosci*. 3:399-406.
- Nance D. M., King T. R. y Nance P. W. 1987. Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats. *Brain Research Bulletin*. 18:109-114.
- Nielsch U. y Keen P. 1987. Effects of neonatal 6-hydroxidopamine administration on afferent substance P-containing sensory neurones. *Eur. J. Pharmacol*. 138:193-197.
- Ogilvy C. S., Silverberg K. R. y Borges L. F. 1991. Sprouting of corneal sensory fibers in rats treated at birth with capsaicin. *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci*. 32:112-121.
- Ojeda S. R., Andrews W. W., Advis J. P. y Smith W. S. 1980. Recent advances in the endocrinology of puberty. *Endocrine Rev*. 1:228-257.
- Ojeda S. R. 1997. Control neuroendocrinotrófico del desarrollo de la función óvarica. *XV Reunion de la asociación latinoamericana de investigadores en reproducción humana*. 27-30 de abril, Cusco, Peru. S2:13.

- Ojeda S. R., White S. S., Aguado L. I., Advis J. P. y Andersen J. M. 1983. Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat. *Neuroendocrinology*. 36:261-267.
- Ojeda S. R. y Urbanski H. F. 1994. Puberty in the rat. En: *The Physiology of Reproduction*, segunda edición. Raven Press-New York. 363-409.
- Otten U., Lorez H. P. y Bushinger F. 1983. Nerve growth factor antagonizes the neurotoxic action of capsaicin on primary sensory neurones. *Nature* 301:515-517.
- Peters H., Byskov A. G., Iintern-Moore S., Faber M. y Andersen M. 1973. The effect of gonadotrophin on follicle growth initiation in the neonatal mouse ovary. *J. Reprod. Fertil.* 35:139-141.
- Peters H. 1979. Some aspects of early follicular development. En: *Ovarian Follicular Development and Function*. Midgley, A.R., Sadle, W.A. (Eds). Raven Press. New York. 1-13.
- Ralevic V., Karoon P. y Burnstock G. 1995. Long-Term sensory denervation by neonatal capsaicin treatment augments sympathetic neurotransmission in rat mesenteric arteries by increasing levels of norepinefrine and selectively enhancing postjunctional actions. *The Journal Pharmacology and Experimental Therapeuti.c* 274(1):64-71.
- Ritter S. y Dinh T. 1988. Capsaicin-induced neuronal degeneration: silver impregnation of cell bodies, axons and terminals in the central nervous system of the adult rat. *J. Comp. Neurol.* 271:79-90.
- Ross M. H., Reith E. J. y Romrell L. J. 1992. Aparato genital femenino. En: *Histologia*. Ed. Médica Panamericana, México. 623-629.
- Saria A., skofitsch G. y Lembeck F. 1982. Distribution of capsaicin in rat tissues after systemic administration. *Journal of Pharmacy and pharmacology*. 34:273-275.
- Schanne F. A., Kane A. B., Young E. E. y Farber J. L. 1979. Calcium dependence of toxic cell death: a final common pathway. *Science*. 206:700-702.
- Shimizu T., Fujita S., Izumi K., Koja T., Ohba N. y Fukuda T. 1984. Corneal lesions induced by the systemic administration of capsaicin in neonatal mice and rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 326:347-351.
- Silver W. L., Mason J. R., Marshall D. A. y Maruniak J. A. 1985. Rat trigeminal, olfactory and taste responses after capsaicin desensitization. *Brain Res.* 333:45-54.
- Smith M. S., Freeman M. E. y Neill J. D. 1975. The control of progesterone secretion during the estrous cycle and early pseudopregnancy in the rat:

prolactin, gonadotropin and steroid levels associated with the rescue of the corpus luteum of pseudopregnancy. *Endocrinology*. 96:219-226.

- Smith-White S. y Ojeda S. R. 1981. Changes in ovarian luteinizing hormone (FSH) receptor content and in gonadotropin-induced ornithine decarboxylase activity during prepubertal and pubertal development of the rat. *Endocrinology*. 109:152-161.
- South E. H. y Ritter R. C. 1988. Capsaicin application to central or peripheral vagal fibers attenuates CCK satiety. *Peptides*. 9:601-612.
- Steiner R., Cameron J., McNeill T., Clifton D. y Bremner W. 1983. Metabolic signals for the onset of puberty. En: *Neuroendocrine aspects of reproduction*. R.L.Norman (Ed). Academic Press New York. 183-229.
- Szallasi A., Joo f. y Blumberg P. M. 1989. Duration of desensitization and ultrastructural changes in dorsal root ganglia in rats treated with resiniferatoxin, an ultrapotent capsaicin analog. *Brain Res*. 503:68-72.
- Szikszay M., Obál F. Jr. y Obál F. 1982. Dose-response relationships in the thermoregulatory effects of capsaicin. *Naunyn Schmiedebergs. Arch. Pharmacol*. 320:97-100.
- Szolcsányi J. 1990. Capsaicin, irritation, and desensitization. Neurophysiological basis and future perspectives. En: *Irritation, Chemical Senses*. B. G. Green, J. R. Mason, and M. R. Kare (Eds), vol.2.pp.141-168, Marcel Dekker, New York and Basel.
- Szolcsányi J. y Jancsó-Gábor A. 1972. Capsaicin and other pungent agents as pharmacological tools in studies on thermoregulation. The pharmacology of thermoregulation. Symp., San Francisco. Basel: Karger; 1973:395-409.
- Szolcsányi J. y Jancsó-Gábor A. 1976. Sensory effects of capsaicin congeners. II. Importance of chemical structure and pungency in desensitizing activity of capsaicin-type compounds. *Drug Res*. 26:33-37.
- Teleisnik S., Caligaris L. y Astrada J. J. 1966. Effect of copulation on the release of pituitary gonadotropins in male and female rats. *Endocrinology*. 79:49-54.
- Terenghi G., Zhang S. Q., Unger W. G. y Polak J. M. 1986. Morphological changes of sensory CGRP-immunoreactive and sympathetic nerves in peripheral tissues following chronic denervation. *Histochemistry*. 86:89-95.
- Traurig H., Cotton J., Papka R., Saria A. y Lembeck F. 1983. Substance P in the female reproductive system and the effects of capsaicin. *Neurosci Abst*. 9:11.

- Traurig H., Saria A. y Lembeck F. 1984a. The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat. *Archives of Pharmacology* 327:254-259.
- Traurig H., Saria A. y Lembeck F. 1984b. Substance P in primary afferent neurones of the female rat reproductive system. *Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmac.* 326:343-346.
- Urbanski H. F. y Ojeda S. R.. 1985. The juvenile-peripubertal transition period in the female rat: Establishment of a diurnal pattern of pulsatile luteinizing hormone secretion. *Endocrinology.* 117:644-649.
- Vitale-Calpe R. y Burgos M. H. 1970. The mechanism of spermiation in the hamster. II. The ultrastructural effects of coitus and of LH administration. *J. Ultrastr Res.* 31:394-400.
- Winter J., Dray A., Wood J. N., Yeats J. C. y Bevan S. 1990. Cellular mechanism of action of resiniferatoxin: a potent sensory neuron excitotoxin. *Brain Res.* 520: 131-140.
- Wood J. N., Coote P. R., Minhas A., Mullaney I., McNeill M. y Burges G. M. 1989. Capsaicin-induced ion fluxes increase cyclic GMP but not cyclic AMP levels in rat sensory neurones in culture. *J. Neurochem.* 53: 1203-1211.
- Wood J. N., Winter J., James I.F., Rang H. P., Yeats J. y Bevan S. 1988. Capsaicin-induced ion fluxes in dorsal root ganglion cells in culture. *J. Neurosci.* 8:3208-3220.