

00387



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN SENSORIAL
EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL
OVARIO. LA RATA ADULTA COMO MODELO DE
ESTUDIO.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
DOCTORA EN CIENCIAS

P R E S E N T A

ANGÉLICA TRUJILLO HERNÁNDEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. ROBERTO DOMÍNGUEZ CASALÁ

México, D.F.

Septiembre 2005



m. 349210



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.



Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Angélica Trujillo Hernández
FECHA: 21/ Septiembre / 2005
FIRMA:

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 27 de junio del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de DOCTORA EN CIENCIAS de la alumna **TRUJILLO HERNÁNDEZ ANGÉLICA** con número de cuenta **500066081**, con la tesis titulada: "**Participación de la Inervación sensorial en la regulación de las funciones del ovario. La rata adulta como modelo de estudio**", bajo la dirección del **Dr. Roberto Domínguez Casalá**.

Presidente:	Dr. Manuel Salas Alvarado
Vocal:	Dra. Leticia Morales Ledesma
Vocal:	Dr. Ignacio Camacho Arroyo
Vocal:	Dr. Alonso Fernández Guasti
Secretario:	Dr. Roberto Domínguez Casalá
Suplente:	Dra. Norma Moreno Mendoza
Suplente:	Dra. Margarita Martínez Gómez

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 31 de agosto del 2005.

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Agradezco al CONACyT el financiamiento otorgado a través de la beca 115228 para la realización de mis estudios de Doctorado.

El presente trabajo se financió con los proyectos:

CONACyT: 29006N

40300/A1

DGAPA-PAPIIT: IN 203799

IN 201702

IN200505

PAEP: 201-327

Agradezco muy especialmente a los miembros del comité tutorial por su invaluable guía y apoyo para la realización de esta tesis:

Dra. Margarita Martínez Gómez

Dra. Leticia Morales Ledesma

Dra. Enrique Pedernera Astegiano

Al Dr. Roberto Domínguez Casalá por su valiosa ayuda e interés en el desarrollo de este trabajo.

Al M.V.Z. Carlos Escamilla Weiman, Director del Bioterio "Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por proporcionar los animales utilizados en este trabajo.

Al Dr. Roberto Chavira del Laboratorio de Hormonas Esteroideas del Instituto Nacional de la Nutrición "Salvador Zubirán" por las determinaciones hormonales.

A la Dra. Laura Riboni Rodríguez, responsable del Laboratorio Biología de la Reproducción de la Escuela de Biología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla por su apoyo en la realización de esta tesis.

Resumen.

Hay evidencias de que la información que se propaga a través de la inervación sensorial participa en la regulación de las funciones del ovario. El presente trabajo investiga los efectos de la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina en ratas adultas cíclicas intactas y hemicastradas en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro sobre la ovulación, las concentraciones plasmáticas de estradiol, progesterona y testosterona, las concentraciones de noradrenalina ovárica, la tasa ovulatoria y la respuesta compensadora del ovario.

Los animales intactos fueron colocados aleatoriamente en uno de los siguientes grupos: 1) animales inyectados subcutáneamente con capsaicina (50mg/Kg) o vehículo (administración sistémica) 2) animales con administración de capsaicina o vehículo dentro de la bursa ovárica (administración local), 3) grupo testigo absoluto. Los animales fueron sacrificados el día del estro después de tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración.

No se observaron diferencias en el ciclo estral o en el número de ovocitos liberados entre el grupo denervado al compararse con el grupo tratado con vehículo o el testigo absoluto. La administración de capsaicina resultó en un incremento significativo en las concentraciones de noradrenalina ovárica, en los animales con administración sistémica de capsaicina en el día del diestro 2 o proestro y en los animales con administración local del neurotóxico en el día del diestro 1, diestro 2 o proestro. Las concentraciones plasmáticas de estradiol y progesterona fueron diferentes dependiendo del día del ciclo estral en el cual se llevó a cabo el tratamiento. Estos resultados sugieren que en la rata adulta intacta, la información que se propaga a través de la inervación sensorial participa junto con la información que se propaga a través de la inervación simpática en la regulación de las funciones del ovario regulando la secreción de hormonas esteroides y que dicha participación varía a lo largo del ciclo estral.

En el siguiente experimento, ratas adultas tratadas sistémicamente con capsaicina o vehículo fueron hemicastradas estableciéndose los siguientes grupos: A) Animales testigo (sin ningún tratamiento farmacológico) fueron

hemicastrados del ovario izquierdo (HClzq) o derecho (HCDer) en el día del diestro 1 o diestro 2. B) Ratas adultas inyectadas con capsaicina (CAP) en el día del diestro 1 (D1) o del diestro 2 (D2) y hemicastradas del ovario izquierdo o derecho (CAP+HC). C) Ratas adultas inyectadas con vehículo (VEH) en el día del D1 o D2 y hemicastradas del ovario izquierdo o derecho (VEH+HC). Se continuó con la toma de frotis vaginales y después de tres ciclos consecutivos de 4 días de duración los animales fueron sacrificados en el día del estro.

Los resultados indican que el establecimiento de la hipertrofia y la ovulación compensadora del ovario, dependen tanto del día del ciclo estral cuando se lleva a cabo la denervación sensorial como del ovario que se extirpa. Estos resultados apoyan la idea ya aceptada de que la respuesta de los ovarios a la denervación es asimétrica. Los resultados presentados aquí sugieren que esta respuesta asimétrica está mediada por alguna información neural que es registrada a nivel de los ovarios y es enviada hacia el sistema nervioso central. Tal información modularía la reactividad de los compartimentos ováricos a las gonadotropinas, y la frecuencia de estas señales varía a lo largo del ciclo estral.

Finalmente, los resultados presentados aquí nos permiten sugerir que en la rata adulta, la información que se propaga a través de la inervación sensorial es un componente neural que participa en el establecimiento de las condiciones neuroendocrinas que regulan las funciones del ovario y que esta participación varía a lo largo del ciclo estral. Además, los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan el concepto de la respuesta asimétrica de los ovarios a la denervación.

ABSTRACT

There is evidence that sensory innervation plays a role in the regulation of puberty. The present study investigates the effects of functional sensorial denervation induced by capsaicin administration to adult female rats in the days of diestrous 1, diestrous 2, pro-oestrous or oestrous on ovulation and serum oestrogen, progesterone and testosterone concentration; the ovarian norepinephrine concentration, the ovulation rate and the compensatory ovarian hypertrophy (COH) and compensatory ovulation (CO).

The animals were allotted at random to one of the following groups: 1) animals injected subcutaneously capsaicin (50 mg/Kg) or vehicle (systemic administration) 2) animals with capsaicin administration or vehicle into the bursa ovarica (local administration), and 3) untreated animals group. The animals were sacrificed on the day of oestrous after three consecutive 4-day oestrous cycles.

No differences were observed in oestrous cyclicity or the average number of ova shed between the denervated animals and the control or vehicle-treated groups. Capsaicin administration resulted in a significant increase in ovarian norepinephrine content, in the animals with capsaicin systemic administration on the day of diestrous 1, diestrous 2 and pro-oestrous; and in the animals with capsaicin local administration on the day of diestrous 2 and pro-oestrous. Serum oestrogen and progesterone concentrations were different, depending on the day of the oestrus cycle in which the treatment was performed. These results suggest that in adult normal female rats, ovarian sensorial information participate together with the sympathetic innervation in the ovarian function regulating the hormone secretion and the follicular development and this participation varies along the oestrous cycle.

The present study too investigates the effects of functional sensorial denervation on the establishment of the compensatory ovarian hypertrophy (COH) and compensatory ovulation (CO).

Animals were injected subcutaneously with capsaicin (50 mg/Kg) or vehicle (systemic administration) on the day of the diestrous 1 or diestrous 2, after the rats presented three consecutive 4-day cycles at the same day of the estrous cycle when they were injected with the vehicle or capsaicin, the rats

were anesthetized with ether, laparotomized, and either the right or left ovary was extirpated. After hemiovariectomy, the estrous cycle was monitored by daily smears, and after the animals presented three consecutive 4-day cycles, they were sacrificed on the morning of the day of estrus.

The results indicate that the establishment of compensatory ovarian hypertrophy (COH) and compensatory ovulation (CO) depends on the day of the estrous cycle when sensorial denervation was performed and on which ovary was extirpated. These results support the now accepted notion that the response of the ovaries to denervation is asymmetrical. The results seem to suggest that this asymmetric response is mediated by some specific neural information that is registered in the ovary and sent to the central nervous system, that such information plays a role modulating the reactivity of the ovarian compartments to gonadotropins, and that the frequency of this signal varies along the estrus cycle.

Finally, current data suggest that the ovarian sensorial information is a neural component that participates in the establishment of the neuroendocrine conditions regulating the ovarian functions and its participation varies along the oestrous cycle. The results herein support the concept of asymmetry in the response of the ovaries to denervation.

INTRODUCCIÓN.

Los ovarios cuyo tamaño es variable según la especie, tienen dos funciones principales: el desarrollo y expulsión del ovocito u ovocitos viables, proceso conocido como ovulación (Fawcett, 1988); y la síntesis de hormonas: estrógenos (E_2), andrógenos (A), progesterona (P_4), inhibina, activina, entre otras.

DESARROLLO FOLICULAR.

La unidad anatómico-funcional del ovario es el folículo ovárico, el cual está constituido por: 1) el ovocito, 2) las células de la granulosa que pueden formar de 1-12 capas alrededor de él, 3) la membrana basal, y 4) las células tecales que forman la teca interna y la teca externa formada por tejido conjuntivo, capilares y terminaciones nerviosas que llegan hasta la membrana basal sin atravesarla (Fawcett, 1988; Greenwald y Roy, 1994).

En el ovario los folículos aparecen en una amplia variedad de tamaños que representan las diferentes fases de su desarrollo. Con base en sus características morfológicas se pueden distinguir (Figura 1):

- folículos primordiales
- folículos primarios
- folículos secundarios o preantrales
- folículos terciarios o antrales
- folículos maduros o preovulatorios

El proceso de maduración y desarrollo del folículo ovárico se inicia con el folículo primordial constituido por el ovocito y una capa de células planas de la granulosa.

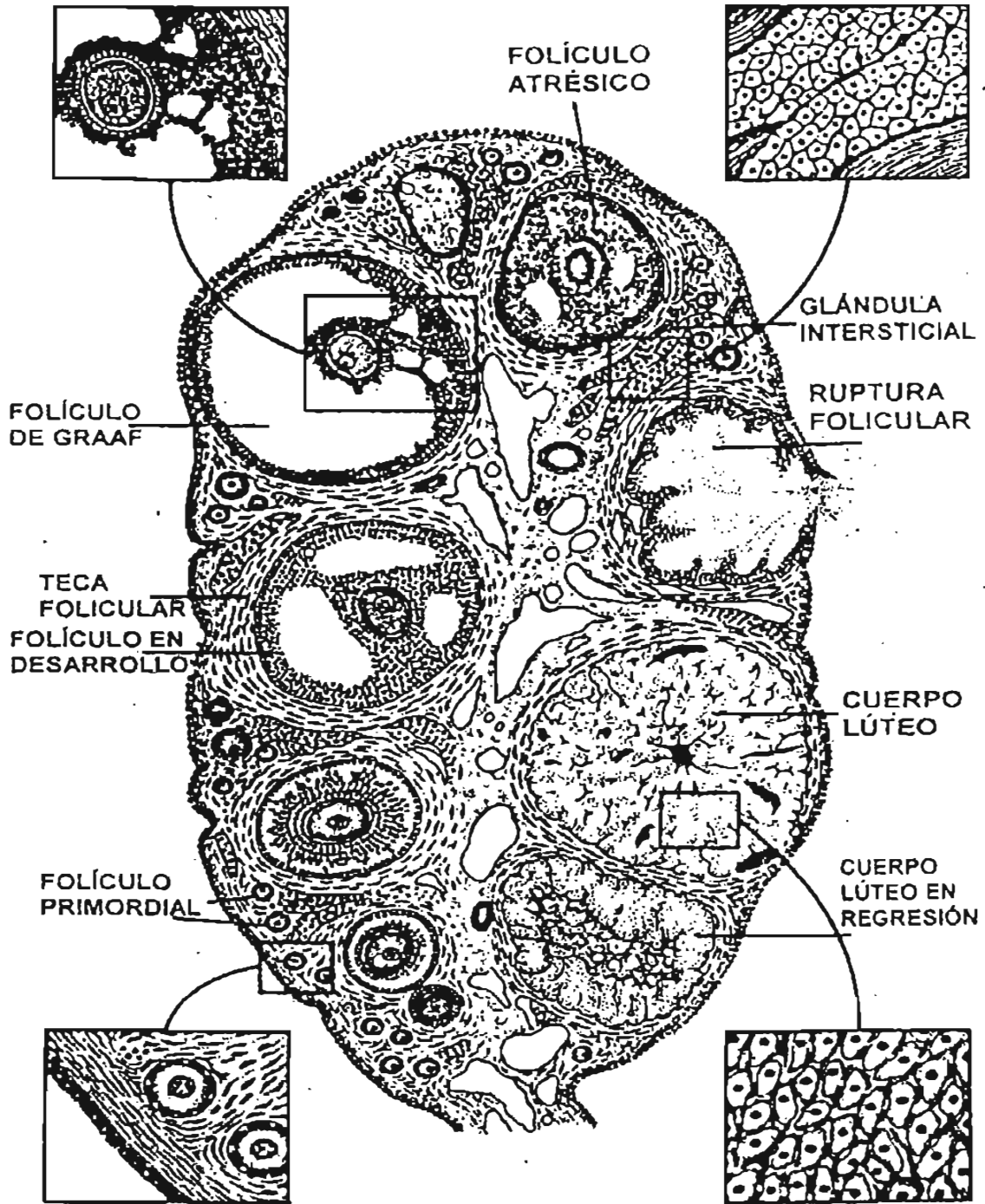


Figura 1. Ovario de mamífero. Se observan las diferentes etapas del desarrollo folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo. Tomado de Feder (1981).

Dependiendo de la especie, esta etapa se completa durante la fase fetal (mujer, mona, cobaya) o en el periodo perinatal (rata, coneja) (Ross, 1990).

Los cambios más evidentes en el folículo primordial para formar un folículo primario son: i) el aumento de tamaño del ovocito, ii) cambio en la forma de las células de la granulosa que pasan de ser aplanadas a cúbicas, iii) incremento del tamaño folicular por división mitótica de las células de la granulosa, iv) formación de la zona pelúcida (Ross, 1990). Cuando se completan de tres a cuatro capas de células granulosas, el folículo pasa a ser un folículo secundario que se caracteriza por la invasión de los capilares a la zona fibrosa que rodea al ovocito y junto con las células teco-intersticiales constituyen la teca interna (Ross, 1990). Esta gran etapa llamada preantral, finaliza cuando entre las células de la granulosa aparecen cúmulos de fluido que se forma por extravasación del plasma y que contiene diferentes sustancias elaboradas por las células de la granulosa en respuesta al estímulo de la hormona folículo estimulante (FSH) de origen adenohipofisario.

A medida que aumenta la cantidad de líquido se constituye una cavidad que lo contiene, el antro folicular, por lo que a partir de este momento al folículo se le denomina terciario. A las etapas posteriores del desarrollo del folículo se les conoce como fases antrales. Junto con el desarrollo del antro, las células tecaales aumentan de tamaño contribuyendo al incremento del diámetro folicular. En términos generales se acepta que el desarrollo de los folículos preantrales es independiente de las gonadotropinas; por el contrario el desarrollo de los folículos antrales depende de éstas y de la presencia de hormonas esteroides (McGee y Hsueh, 2000).

Se conoce poco acerca de la señal que promueve el inicio del desarrollo de los folículos primordiales hasta folículos preovulatorios, pero se sabe que es necesaria la presencia del ovocito para que se lleve a cabo este proceso. No existen evidencias que nos indiquen con exactitud los mecanismos responsables de la folículogénesis, del crecimiento y de la selección de los ovocitos que serán liberados. Se ha sugerido que el incremento en las concentraciones de FSH que ocurre después de la ovulación participa en la selección de los folículos que serán ovulados en el ciclo siguiente (Hirshfield y Midgley, 1978).

Las gonadotropinas no son las únicas señales a las que se les ha asociado con el proceso de selección folicular y foliculogénesis. Evidencias recientes muestran que los neuropéptidos, junto con los factores de crecimiento, están involucrados en la regulación de los mecanismos del crecimiento folicular. Los factores de crecimiento parecidos a la insulina (IGFs) participan en la regulación del desarrollo de los folículos ováricos. En la rata, el RNAm de IGF-I se expresa en las células de la granulosa, mientras que el RNAm de IGF-II se expresa en las células tecaes. Además, las células de la granulosa expresan al IGF-I durante las primeras etapas de desarrollo folicular y la actividad de este factor se ve incrementada significativamente en los folículos sanos, mientras que tal actividad no se presenta en los folículos atrésicos. Estos resultados llevan a sugerir que, en la rata, la selección de los folículos dominantes sanos requiere de la expresión continua de IGF-I en las células granulosas (Wang y Chard, 1999). Otro de los neuropéptidos que regulan las funciones del ovario es el péptido intestinal vasoactivo (VIP). En presencia del VIP, el cultivo de células del ovario de ratas de 30 días de vida, tratadas un día antes con 2 ui de gonadotropina de suero de

yegua preñada (PMSG) incrementa la secreción de estrógenos (Ahmed y col., 1986). En ovarios fetales de rata este péptido incrementa la formación de AMPc y la actividad de la aromatasas (George y Ojeda, 1987).

Existen evidencias que muestran el papel potencial del ovocito en el desarrollo folicular, así estudios recientes muestran que el factor de diferenciación y crecimiento 9 (GDF-9) participa regulando el desarrollo folicular. Este factor se expresa en el ovocito de los folículos, desde primarios hasta preovulatorios, de la ratona, la rata y la mujer (McGrath y col., 1995; Hayashu y col., 1999; Elvin y col., 1999; Aaltonen y col., 1999). En el ratón mutante, la alteración del gene GDF-9 interrumpe el desarrollo folicular asociado con la eventual muerte del ovocito (Elvin y col., 1999).

CUERPO LÚTEO.

Después de la ovulación y de la eliminación del líquido folicular, la pared del folículo se colapsa y el folículo que queda roto se transforma rápidamente en una estructura glandular llamada cuerpo lúteo. La formación del cuerpo lúteo se caracteriza por una serie de cambios morfológicos y bioquímicos en las células de la teca interna y de la capa de células de la granulosa, proceso que se conoce con el nombre de luteinización (Niswender y Terry, 1988).

El inicio del proceso de luteinización parece no estar sujeto al control hormonal sino que es iniciado por la salida del ovocito del folículo durante la ovulación. Estudios *in vitro* han mostrado que el ovocito inhibe los cambios morfológicos que se presentan en las células granulosas durante la luteinización (Niswender y Terry, 1988).

En los primates el cuerpo lúteo está formado por dos clases de células: las células teco-luteínicas, que se originan de las células de la teca interna; y las células granuloso-luteínicas que se originan de la capa de células de la granulosa (Fawcett, 1988). Las células tecoluteínicas miden aproximadamente 15 μm de diámetro, se encuentran ubicadas en la periferia y se tiñen más fuertemente al usar la técnica de hematoxilina-eosina; en contraste las células granuloso-luteínicas son de aspecto claro y miden hasta 30 μm de diámetro. En la luteinización de las células de la granulosa hay un cambio en la forma de las mitocondrias, una transformación del denso patrón heterocromático del núcleo que da como resultado un nucleoplasma más homogéneo donde resalta la presencia de un nucléolo único y por lo tanto más llamativo, transformación del aparato de Golgi único en las células de la granulosa a pequeños y numerosos apilamientos de cisternas dispersos por el citoplasma de las células luteínicas; y aumento en el número de lisosomas (Fawcett, 1988). La adquisición de las características ultraestructurales de las células luteínicas se correlaciona con la síntesis de cantidades progresivamente crecientes de P_4 (Fawcett, 1988). Después de la ovulación, este cuerpo lúteo constituye la mayor fuente de hormonas esteroideas sexuales (Ross, 1990).

Al final de la vida del cuerpo lúteo la secreción de P_4 cesa y las células lúteas degeneran, proceso que se conoce con el nombre de regresión del cuerpo lúteo o luteólisis. Durante esta etapa las membranas de las células del cuerpo lúteo presentan desmosomas, uniones adherentes, invaginaciones y microvellosidades; se observan numerosos residuos de lípidos, con disminución

en la cantidad de retículo endoplásmico liso y un incremento en el número de vacuolas y lisosomas. Las células ya atrofiadas parecen ser removidas por macrófagos (Niswender y Terry, 1988).

El proceso de la luteólisis en la mujer inicia con una disminución en las concentraciones de progesterona junto con el inicio de alteraciones morfológicas en la estructura de las células del cuerpo lúteo. Se han propuesto una amplia variedad de moléculas como mediadores de la luteólisis tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), el ligando Fas/Fas, caspasa-3 y la proteína morfogénica del hueso (BMP) (Hasumoto y col., 1997; Ámsterdam y col., 1998; Young y col., 1998; Kuranaga y col., 1999; Kiso y col., 2003).

ATRESIA FOLICULAR .

Los folículos que no son ovulados quedan detenidos en diferentes fases del desarrollo; estos folículos entran a un proceso de regresión llamado atresia folicular (Fawcett, 1988).

La atresia es un proceso que se presenta en todos los vertebrados. Este proceso se caracteriza por la presencia de alteraciones morfológicas en la estructura folicular, con un incremento sucesivo de picnosis nuclear en las células de la granulosa, así como una actividad fagocítica masiva que finalmente lleva a la destrucción de este tipo celular. En el ovocito se observa degeneración del núcleo que incluye la alineación de los cromosomas en metafase y una posible expulsión del cuerpo polar. La membrana nuclear pierde su apariencia bilaminar y se observa un engrosamiento de la zona pelúcida, así como cambios en las propiedades histoquímicas de ésta, que pudieran ser resultado de la alteración

bioquímica de los mucopolisacáridos. Otra característica sobresaliente es la pérdida de desmosomas entre el ovocito y las células granulosas adyacentes. A diferencia de lo que sucede con las células de la granulosa, en las células de la teca las alteraciones morfológicas ocurren hasta varios días después de que es afectado el folículo. Dichos cambios provocan que las células de la teca interna aumenten de tamaño, con núcleos grandes en relación con el citoplasma y una membrana plasmática muy plegada (Greenwald y Roy, 1994; Hirshfield y Midgley, 1978).

Los folículos pueden llegar a ser atrésicos en cualquier fase del desarrollo folicular, de tal manera que cuando el folículo inicia el crecimiento tiene dos caminos: ovular o ir a la atresia. En la rata, existe un período crítico durante el desarrollo folicular en el que se determina el destino del folículo. Al parecer este fenómeno ocurre una vez que el folículo presenta el antro folicular (Fortune, 1994).

Hsueh y colaboradores (1994) propusieron que en los folículos con antro se pueden distinguir tres estados de atresia:

Estado I. Se caracteriza por la presencia de células de la granulosa con núcleo picnótico (menos del 10%). Estas células también presentan una disminución en su capacidad de incorporar timidina tritiada.

Estado II. Un mayor número de células de la granulosa presentan núcleos picnóticos (10-30%) y una menor incorporación de timidina tritiada. Hay pocas células en mitosis y existe la presencia de células de la granulosa descamadas en el antro. La membrana basal pierde su integridad y los leucocitos invaden el folículo.

Estado III. Se caracteriza por una reducción en el número de células de la granulosa, las células de la teca se atrofian y el folículo se colapsa.

Las señales exactas así como los receptores y las vías de señalización intracelular que están involucradas en el proceso de apoptosis de las células de la granulosa no son muy claras, ya que este proceso involucra la participación de múltiples factores tanto de sobrevivencia como atretogénicos (Fas, caspasas, TNF, TVB, Par-4, p53, prohibitina, c-Myc, IFN, las endotelinas, las gonadotropinas, IGF-1, interleucina 1 β , el factor de crecimiento epidermal, el factor de crecimiento fibroblástico, TGF- α , bcl-2, bcl-x_{long}, TGF- β , interleucina-6, andrógenos, bax, y caspasas); la apoptosis de las células de la granulosa depende de un delicado balance entre estas moléculas (Hussein, 2005).

REGULACIÓN DE LA FOLICULOGÉNESIS.

La regulación hormonal de las funciones ováricas involucra la participación de la hormona liberadora de las gonadotropinas (GnRH), de las hormonas hipofisiarias y de las hormonas esteroideas. Las neuronas secretoras de GnRH constituyen la vía final común por medio de la cual el sistema nervioso central (SNC) controla la secreción de las gonadotropinas. La GnRH es sintetizada por neuronas peptidérgicas que se originan de la placoda olfatoria (Wray y col., 1989), desde donde migran y se ubican preponderantemente en áreas rostrales del diencefalo (órgano vasculoso de la lámina terminal); hipotálamo anterior (área preóptica hipotalámica anterior) e hipotálamo medio (núcleos ventromedial y arcuato) (Silverman y col., 1979). La GnRH es liberada en las terminales axónicas

de las neuronas GnRHérgicas, localizadas en la eminencia media, hacia la circulación portal-hipotálamo-hipofisiaria y alcanzan por esta vía a la adenohipófisis.

Estudios *in vitro* indican que la llegada de un potencial de acción a las neuronas productoras del GnRH provoca una entrada de iones de calcio resultado de la activación de canales de calcio dependientes de voltaje. Estos eventos provocan la fusión de vesículas que contienen al GnRH en la membrana de la terminal, lo que induce la liberación del neuropéptido por exocitosis (Silverman y col., 1994).

Las neuronas que secretan el GnRH lo hacen como modelo sincronizado y fásico, con aumentos bruscos de secreción ("picos"), cuya frecuencia depende de la especie en estudio. A este modelo de secreción Knobil lo denominó "generador de pulso GnRHérgico" (Knobil y col., 1980). En todas las especies de mamíferos estudiadas, la secreción de GnRH en el animal adulto es de tipo "pulsátil" (Knobil, 1989).

La secreción de GnRH es regulada por neurotransmisores que pertenecen a los sistemas colinérgico, catecolaminérgico, opioide y peptidérgico (Kordon y col., 1994). Por técnicas de inmunohistoquímica de doble marcaje, se describieron sinapsis aferentes en las células GnRHérgicas que contienen diferentes tipos de neurotransmisores: noradrenalina (NA), dopamina (DA), serotonina (5-HT), ácido gama amino- -butírico (GABA), β -endorfina (β E) y factor liberador de corticotrofina (CRF) (Kordon y col., 1994).

El generador de "pulsos" parece estar controlado o modulado por los elementos neurales que forman parte de esta compleja red anatómica. Las neuronas dopaminérgicas, β -endorfinérgicas y gabaérgicas parecen ser las más importantes dentro de esta red, ya que inhiben la liberación de GnRH y esto se refleja en la liberación de gonadotropinas, fundamentalmente de la LH. El alto porcentaje de mediadores inhibitorios sobre el generador de "pulsos", podría ser responsable de la baja frecuencia de descarga que éste presenta en el animal adulto (aproximadamente un "pulso" por hora) (Kordon y col., 1994).

Los esteroides están involucrados en la regulación de numerosas funciones en el SNC. En el hipotálamo uno de los papeles más importante del estradiol es la regulación de las funciones reproductoras, ya que modulan la secreción de la GnRH y gonadotropinas (Conn, 1994). La regulación de la secreción del GnRH está mediada por dos isoformas del receptor a estrógenos: el receptor a estrógenos α (ER- α) y β (ER- β) (Kuiper y col., 1997; Laflamme y col., 1998). Las interneuronas gabaérgicas, dopaminérgicas y β -endorfinérgicas presentan ambos tipos de receptores a estrógenos, y modulan indirectamente las acciones de las neuronas GnRHérgicas. Las neuronas GnRHérgicas hipotalámicas sólo expresan el receptor ER- β (Kallo y col., 2001).

La GnRH estimula tanto la liberación de la LH como de la FSH mediante la unión a receptores específicos de alta afinidad localizados en las membranas plasmáticas de los gonadotropos localizados en la adenohipófisis (Richards, 1980).

En la rata, la FSH secretada por la adenohipófisis es transportada al ovario por la sangre hasta llegar a las células granulosas de los folículos ováricos, donde se une a su receptor en la membrana celular. El complejo receptor-hormona actúa sobre el sistema de la adenilato ciclasa, provoca el aumento del AMPc y estimula la síntesis y actividad de la aromatasa, enzima indispensable en la síntesis de estrógenos. Así, la FSH estimula el crecimiento y la maduración de los folículos en el ovario. Conjuntamente con tales efectos, la FSH regula el gen que codifica para el receptor a la LH, de esta manera el folículo ovárico es capaz de responder al estímulo de la LH (Segaloff y col., 1990).

La lista de genes que están regulados por la acción de la FSH es extensa e incluye a aquellos que codifican para la P₄₅₀ aromatasa crucial para la síntesis de estrógenos (Hickey y col, 1988; Steinkampf y col, 1988); los genes que codifican para la expresión de factores de crecimiento (Hernández y col., 1988), enzimas proteolíticas e inhibidores implicados en el mecanismo de ovulación (O'Connell y col., 1987; Ny y col., 1985); así como el gen que codifica para péptidos reguladores como inhibina, activina y folistatina (Dissen y col., 1993).

La secreción de estrógenos por los folículos se incrementa durante la fase folicular, lo que provoca que se incremente la frecuencia de descarga pulsátil de la LH y decline la de FSH. Durante este estado del desarrollo del folículo, las células de la granulosa expresan los receptores a LH. Los receptores a LH están localizados en las células tecales y las de la granulosa (Erickson y col., 1985). La LH actúa por medio de su unión a sus receptores activando a la adenilato ciclasa lo cual resulta en un incremento en la captura de colesterol y en un incremento en la secreción de andrógenos y estrógenos (Gwynne y Strauss, 1982). La LH

también activa la transmisión de señales en las células tecaes y las intersticiales a través de la hidrólisis de lípidos de inositol y de vías que involucran la participación de las proteína-quinasas de tipo C (Leung y Steele, 1992).

A mitad del ciclo estral, cuando los folículos dominantes alcanzan su madurez, el estradiol circulante llega a su máxima concentración lo que ejerce un efecto estimulante sobre la hipófisis, dando por resultado la elevación repentina en las concentraciones de LH, lo que desencadena la ruptura del folículo y la expulsión del ovocito (Domínguez y col., 1991). La LH regula también la síntesis de estrógenos por sus efectos sobre la producción de andrógenos por las células tecaes y por la estimulación de la síntesis de la aromatasa en las células de la granulosa.

ESTEROIDOGÉNESIS.

En la síntesis de estrógenos participan dos tipos de células del folículo: la célula tecointersticial y la granulosa.

Para la producción de las hormonas esteroideas se requiere colesterol, que proviene de tres fuentes: 1) de la vía sanguínea, a partir de las lipoproteínas circulantes, 2) el almacenado en las células ováricas y 3) de la síntesis de *novo* a partir de acetato, producto del metabolismo de carbohidratos, grasas y proteínas.

La fuente principal de colesterol es la vía sanguínea; las células de la teca interna son capaces de obtener el colesterol a partir de lipoproteínas de baja y alta densidad e iniciar la biosíntesis de esteroideas cuyo primer paso es la formación de la pregnenolona. Durante este proceso participa un complejo multienzimático integrado por la citocromo P-450 scc, una flavoproteína transportadora de

electrones, la flavina adenina dinucleótido (FAD) y una proteína de tipo hemo, la luteodoxina, que actúa como intermediaria de las dos anteriores (Pedernera, 1993).

A partir de la pregnenolona se pueden seguir dos vías de biosíntesis que dan lugar a diferentes compuestos. En breve, la vía metabólica Δ^4 involucra la transformación de pregnenolona a P_4 gracias a la presencia de la 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa/ $\Delta^5 - \Delta^4$ isomerasa (3β -HSD), dando como resultado la formación de androstenediona. La otra opción es que la pregnenolona sea transformada por la vía metabólica Δ^5 , en este caso la pregnenolona será metabolizada por el complejo enzimático citocromo P-450 17α -hidroxilasa/ 17 - 20 liasa (P-450 C17) dando como resultado la producción de dehidroepiandrostenediona (DHEA), la DHEA puede a su vez ser transformada a androstenediona por la 3β -HSD (Ver Figura 2).

Las células de la teca interna tienen las enzimas que les permiten sintetizar andrógenos a partir de pregnenolona. El paso limitante en la biosíntesis de los andrógenos es la expresión del complejo P-450 C17, el cual es estimulado por la LH. Los andrógenos atraviesan la membrana basal y son incorporados al citoplasma de las células de la granulosa donde son aromatizados. La aromatización es realizada por otro complejo enzimático el citocromo P-450 aromatasa cuya síntesis depende del estímulo de FSH y la LH (Pedernera, 1993; Gore-Langton y Armstrong, 1994). La biosíntesis de los esteroides en las células tecales es estimulada exclusivamente por la LH. Cuando los folículos maduran, las células de la granulosa adquieren receptores plasmáticos para LH y prolactina

como resultado de la acción de la FSH y la estimulación por estrógenos, provocando la estimulación de la síntesis y la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa que fueron previamente estimuladas por la FSH (Hsueh y col., 1983a; Hsueh y col., 1983b).

La síntesis de los estrógenos es regulada por varias hormonas y neurohormonas, cada una de las cuales estimulan o inhiben algunos pasos específicos de la biosíntesis en las células tecointersticiales, en las células de la granulosa o en ambas. Los efectos de la LH sobre la síntesis de estrógenos son amplificados por su liberación pulsátil, ya que la respuesta secretora es controlada tanto por la amplitud como por la frecuencia de los pulsos de LH (Domínguez y col., 1991).

La prolactina inhibe la actividad de la aromatasa en las células de la granulosa y bloquea los efectos de la FSH sobre las mismas, lo que provoca una disminución en la producción de estrógenos (Domínguez y col., 1991) y bloquea la síntesis de andrógenos al disminuir la formación del AMPc en las células tecales (Bonifacino y Dufau, 1984).

Otro mecanismo que regula la secreción de estrógenos es el que involucra la participación de factores parácrinos sintetizados tanto por las células de la teca, como por la capa de células de la granulosa. El TGF- β es sintetizado tanto por células de la teca como por las células de la granulosa (Skinner y col., 1987; Bendell y Dorrington, 1988; Kim y Schomberg, 1989); en la rata, la estimulación de las células teco-intersticiales en cultivo con TGF- β , resulta en una inhibición en la síntesis de andrógenos y aumento en la síntesis de P₄ (Magoffin y col., 1989). En

la rata, el factor de crecimiento parecido a la insulina tipo I (IGF-I), estimula la actividad de la P450 scc e induce la aparición del receptor a LH en las células de la granulosa, mientras que en las células de la teca estimula la expresión de la 3 β -HSD y la P450 scc en presencia de LH (Magoffin y Weitsman, 1993):

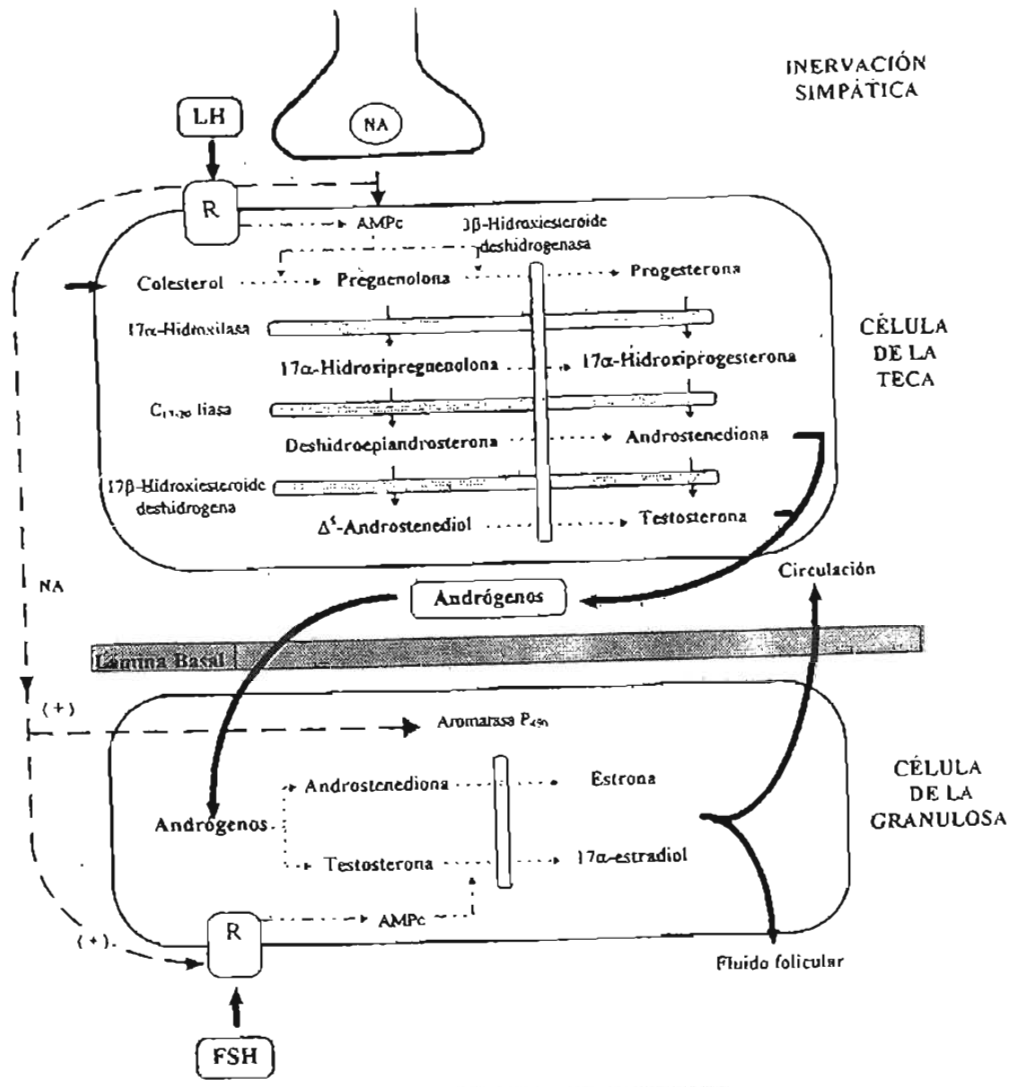


Figura 2. Rutas biosintéticas de las hormonas esteroides y la participación de la inervación simpática en la regulación de los efectos de las gonadotropinas en las células del folículo ovárico. Modificado de Gore-Langton y Armstrong, 1994.

INERVACIÓN DEL OVARIO.

Aunque existen considerables variaciones entre especies, el ovario de ratas adultas está inervado por fibras simpáticas que llegan al ovario por medio del plexo ovárico (PO) y del nervio ovárico superior (NOS); por fibras parasimpáticas que provienen del nervio vago (Hill, 1962; Burden y Lawrence, 1977) y de los segmentos S2-S4 de la médula espinal; y fibras sensoriales aportadas en su mayor parte por el nervio vago (Mitchel, 1988).

ORIGEN Y NATURALEZA DE LAS FIBRAS.

El PO se origina de los plexos aórtico y renal, cuyos cuerpos celulares preganglionares se localizan en los segmentos T10 y T11 de la médula espinal.

El NOS es una rama del plexo celíaco, cuyos cuerpos celulares se originan en los segmentos T11 a L4 de la cadena ganglionar simpática paravertebral, las fibras que salen de aquí hacen sinapsis con el ganglio celiaco y el mesentérico antes de inervar al ovario (Burden, 1985; Lawrence y Burden, 1980; Klein y Burden, 1988a).

Las fibras del NOS y del PO (Ver Figura 3) se consideran predominantemente catecolaminérgicas, aunque a través de estos nervios también transcurren fibras peptidérgicas (Dissen y Ojeda, 1999). Entre las más abundantes encontramos a las fibras que son inmunoreactivas al péptido intestinal vasoactivo (VIP) y el neuropéptido Y (NPY) que llegan al ovario por medio del NOS, mientras que las fibras inmunoreactivas a la sustancia P (SP) y al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP) lo hacen por el plexo ovárico (Klein y Burden, 1988a; Dees y col., 1986).

La inervación parasimpática la proporciona predominantemente el nervio vago (Ver Figura 4). El soma de las neuronas del nervio vago que inervan al ovario, se localizan en el ganglio nodoso (Burden y col., 1983). En general, se acepta que más del 90% de sus fibras son de naturaleza sensorial (Gerendai y col., 1998). Por pruebas inmunohistoquímicas se ha mostrado que en el nervio vago se almacena y se libera sustancia P (SP), en cantidades considerablemente mayores que otros neuropéptidos como el VIP o la somatostatina (Brown, 1994; Gilbert y col., 1980). Existen otras fibras sensoriales que se localizan en el ovario y que se originan en los segmentos T9-T11 y L2-L4 de la médula espinal y llegan al órgano vía el PO y tienen como principales neurotransmisores a la SP y al CGRP (McNeill y Burden, 1987; Klein y Burden, 1988b; Nance y col., 1987; Papka y col., 1985).

Otro aporte a la inervación parasimpática que recibe la gónada tiene su origen en los segmentos S2-S4 de la médula espinal y llega al ovario por medio del plexo hipogástrico (Mitchel, 1988), aunque en la rata existen controversias sobre si el plexo contribuye a la inervación del ovario (Burden, 1985).

Las neuronas sensoriales aferentes, además de desempeñar su función sensorial también forman parte de los sistemas efectores locales como la respuesta inflamatoria y la respuesta que se desencadena ante lesiones de tejidos (Holzer, 1998). Así, las terminales sensoriales son capaces de conducir impulsos antidrómicos (Traurig y col., 1984; Holzer, 1991).

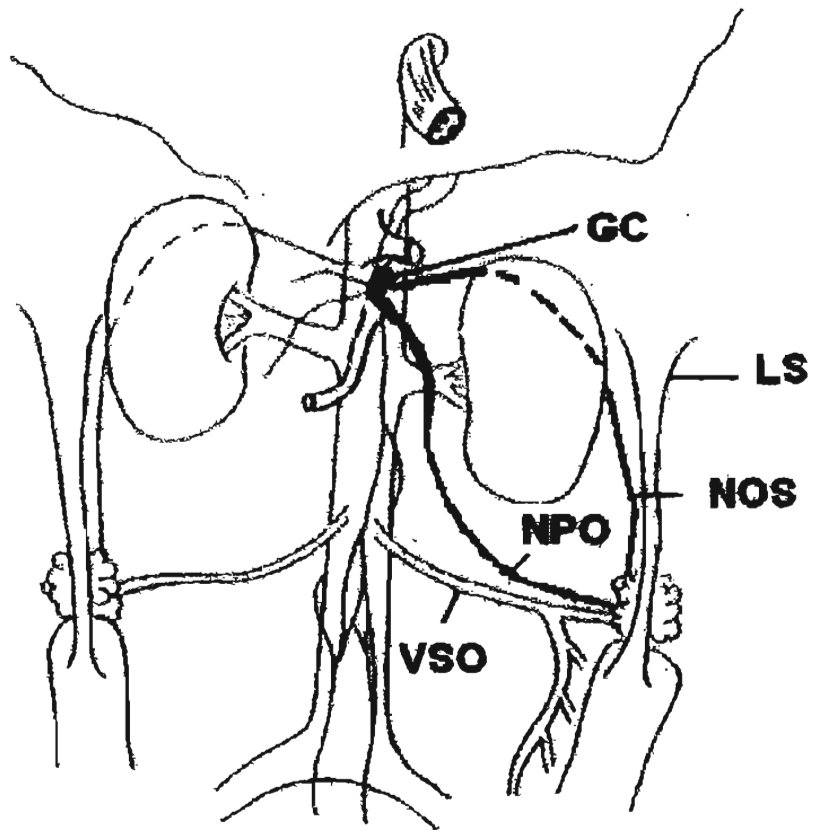


Figura 3. Trayecto que siguen los nervios simpáticos ováricos. GC, ganglio celiaco; LS, ligamento suspensorio; NOS, nervio ovarico superior; NPO, nervio del plexo ovarico; VSO, vasos sanguíneos ováricos. Tomado de Klein y Burden, 1988a.

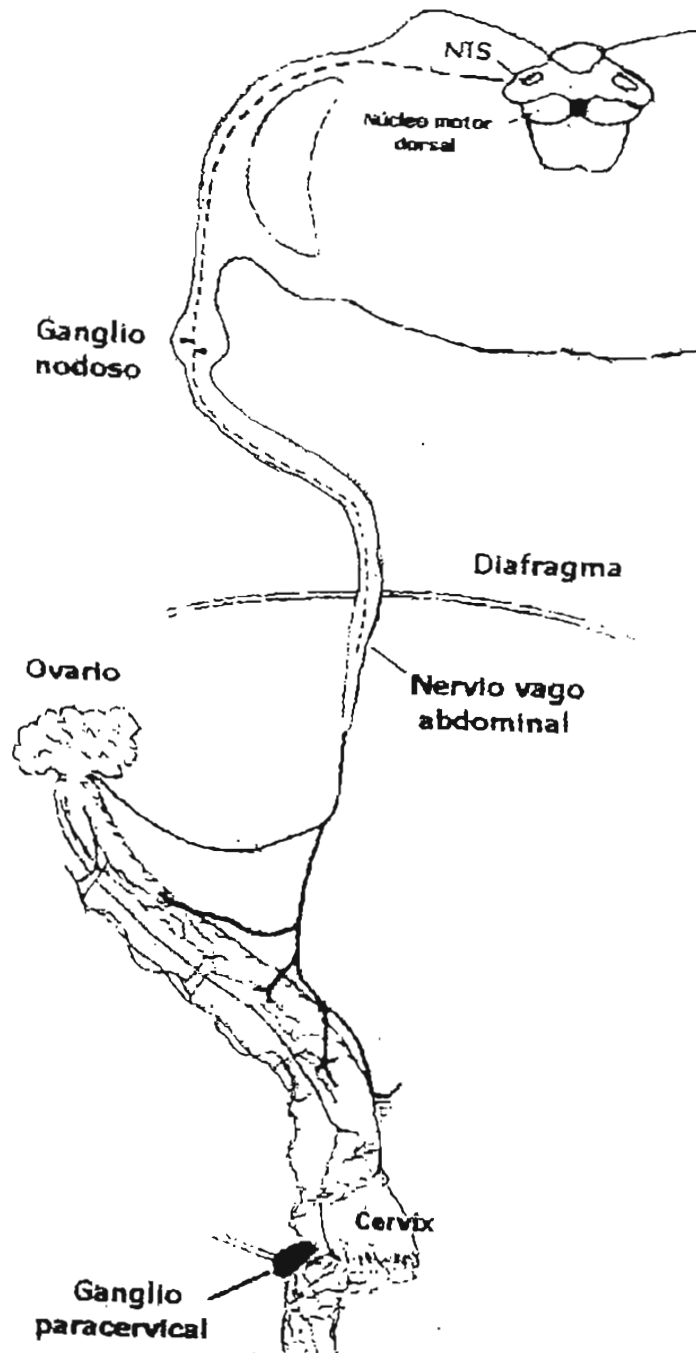


Figura 4. Curso hipotético que recorre el nervio vago para conectar al ovario, el útero y el cervix con el ganglio nodoso y el núcleo del tracto solitario (NTS). Modificado de Collins y col., 1999.

LOCALIZACIÓN INTRAOVÁRICA

Las fibras simpáticas convergen en la mayor parte de la vasculatura ovárica, en el hilio y la médula. En el folículo ovárico las fibras simpáticas están asociadas con células de la teca, y en ningún momento hacen contacto con las células de la granulosa (Burden, 1985).

La localización de las fibras sensoriales respecto al folículo ovárico es controversial. La mayor parte de las evidencias muestran que se encuentran exclusivamente cercanas a los vasos sanguíneos (Burden, 1985; Dees y col., 1986) y algunos autores indican que se encuentran en las inmediaciones de los folículos en crecimiento e inervan el tejido intersticial ovárico (Calka y col., 1988).

Hay evidencias de que la glándula por sí misma contiene una subpoblación de neuronas intrínsecas. Hace más de un siglo Winterhalter (1896), usando la técnica de impregnación argéntica, describió por primera vez la presencia de neuronas en la médula del ovario de la mujer. Usando un método similar, en el ovario de la ratona y la coneja, fue descrito un ganglio ovárico, pero fue imposible demostrarlo en el ovario de la perra (Burden, 1978). Más recientemente Dees y colaboradores (1995) usando métodos inmunohistoquímicos identificaron cuerpos neuronales en el ovario de dos especies de primates adultos: *Macaca mulata* y *Macaca fuscata*.

La naturaleza de las primeras fibras que se localizaron en el ovario implicaba la presencia de neuronas intrínsecas positivas para la tirosina hidroxilasa (TH), enzima limitante en la biosíntesis de catecolaminas, además de que la mayoría de estas neuronas contiene el receptor de baja afinidad para el factor de crecimiento neural (NGFr). La naturaleza catecolaminérgica de éstas

células fue recientemente confirmada por la detección del RNAm que codifica tanto para la tirosina hidroxilasa como para la dopamina β -hidroxilasa; enzimas que participan en la síntesis de catecolaminas (Mayerhofer y col., 1998).

D'Albora y Barcia (1996) usando técnicas de impregnación de plata y criterios morfológicos, visualizaron ganglios y neuronas aisladas en el ovario de ratas Wistar adultas y prepúberes. Pero no hay evidencia de la presencia de estas neuronas en los ovarios de las ratas Sprague-Dawley que pueda determinarse tanto por criterios morfológicos como inmunohistoquímicos.

D'Albora y colaboradores (2000) visualizan neuronas intrínsecas tanto en el hilio como en la médula del ovario de ratas Wistar. Estas neuronas están ausentes en el periodo neonatal (1-7 días de edad), y aparecen en el periodo infantil (2 semanas de edad). Las neuronas identificadas por su morfología y por la expresión de NeuN (proteína nuclear específica de neuronas), fueron detectadas desde el día 14 hasta el día 50 de vida del animal. Las neuronas inmunoreactivas a TH están presentes de manera predominante en la corteza del ovario y pueden aparecer como neuronas aisladas o encerradas en ganglios. Existen escasas neuronas multipolares inmunoreactivas a NPY localizadas en la médula del ovario de ratas Wistar (D'Albora y col., 2000). Esta inervación intrínseca del ovario podría ser un elemento más a considerar en la participación de la regulación de las funciones de la gónada.

PAPEL DEL NERVIO VAGO EN LA REGULACIÓN DE LAS FUNCIONES DEL OVARIO.

La inervación sensorial que reciben los ovarios, proviene predominantemente del nervio vago. Una de las herramientas utilizadas para analizar la participación de la inervación sensorial en la regulación de la gónada es la denervación quirúrgica.

En la rata prepúber, la vagotomía bilateral provoca retraso en el inicio de la pubertad. La estimulación *in vitro* de los ovarios denervados, con la gonadotropina coriónica humana (hCG), resulta en una disminución en la concentración de estrógenos (Ojeda y col., 1983). Estudios *in vivo* muestran que la sección de los nervios vagos produce retraso en la pubertad sin que se observen cambios en las concentraciones plasmáticas de FSH o LH ni en la cantidad de sus receptores en los ovarios, lo que indica que la acción de las gonadotropinas no se ve modificada por la falta de este tipo de inervación, pero sí afectaría la esteroidogénesis (Ojeda y col., 1983).

En la rata prepúber de 24 días de edad la vagotomía unilateral resulta en un retraso en el establecimiento de la pubertad, así como una disminución en las concentraciones plasmáticas de E_2 . Cuando la vagotomía unilateral se realizó en animales de 28 días de vida se observó una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas tanto de E_2 como de P_4 .

Por otro lado, la vagotomía bilateral, en ratas de 24 ó 28 días de vida resultó en un retraso en el establecimiento de la pubertad. Cuando la intervención quirúrgica se realizó en animales de 24 días de vida, el tratamiento resultó en una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de E_2 y un incremento

en las de P₄. La denervación bilateral en ratas de 28 días de edad resultó en un incremento en el número de ovocitos liberados por animal ovulante, así como en una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de E₂ y P₄ (Morales y col., 2004).

En la rata de 15 días de edad, la sección del nervio vago izquierdo bloquea la hipertrofia compensadora y retrasa el inicio de la pubertad, efectos que no se presentan si secciona el vago derecho o si la intervención se realiza a los 19 días de edad. Los resultados llevan a los autores a sugerir que la modulación que ejerce la información neural que transcurre por el vago varía con la edad del animal y presenta lateralización (Gerendai y Nemeskéri, 1983).

Utilizando la denervación quirúrgica, varios autores han mostrado que en la rata adulta, la vagotomía bilateral, interrumpe el ciclo estral (Carlson y DeFeo, 1965; Burden y Lawrence, 1977), bloquea la inducción de la pseudopreñez (Burden y col., 1981) e induce diferencias en la respuesta ovulatoria espontánea por el ovario izquierdo y el derecho (Cruz y col., 1986).

En la rata adulta hemicastrada, la sección bilateral del vago bloquea la hipertrofia compensadora ovárica (Burden y Lawrence, 1977), mientras que la respuesta de ovulación compensadora depende del ovario remanente (Chávez y col., 1987). En la rata preñada la vagotomía bilateral induce disminución en la concentración sérica de LH y causa la reabsorción de los fetos (Lawrence y col., 1978). Los efectos de la sección del nervio vago muestran que la información que llega a los ovarios por intermedio de este nervio participa en la regulación de la función de la gónada.

Como el ovario recibe inervación por vía del sistema simpático, del parasimpático y fibras sensoriales, permite sugerir la existencia de un vínculo neural entre el SNC (hipotálamo) y el ovario.

Una de las primeras evidencias que apoyan esta hipótesis fue mostrada por Kawakami y colaboradores (1981) quienes, usando ratas hipofisectomizadas y adrenalectomizadas con estimulación eléctrica en distintas regiones del hipotálamo, observaron un incremento en la liberación de E_2 y P_4 una hora después de llevar a cabo el tratamiento. Este efecto se presentó sin que se observaran modificaciones en las concentraciones séricas de GnRH, LH, FSH, o en el flujo sanguíneo del ovario (Kawakami y col., 1981).

De las evidencias morfológicas que apoyan la hipótesis de la conexión entre el SNC y el ovario, se encuentran los trabajos recientes de Gerendai y colaboradores (1998, 2000). Las estructuras del SNC que se marcan después de 92-96 horas de la inyección intraovárica del virus de la pseudorabia (PRV- Bartha) incluyen: médula espinal, diencefalo, mesencefalo y médula/puente.

La vagotomía inhibe el marcaje de muchas de estas estructuras, entre las que se encuentran: el núcleo del tracto solitario, núcleo ambiguo, complejo vagal dorsal, área postrema, grupo celular A7, Núcleo de Barrington, Locus coeruleus, sustancia gris periacueductual y el Hipotálamo dorsal (Gerendai y col., 2000).

De estos estudios se puede asumir que las estructuras que se marcan por la inyección del PVR en el ovario después de la vagotomía están conectadas, al menos parcialmente, con el sistema simpático, mientras que aquellas que no se marcaron después de la vagotomía pero que se marcaron en los animales testigo constituyen la vía por la cual el sistema parasimpático establece comunicación

entre el ovario y el hipotálamo y que participaría en el control de las funciones de la gónada (Gerendai y col., 2000).

CAPSAICINA.

Otra de las herramientas utilizadas para estudiar la participación de la inervación sobre la regulación de las funciones del ovario, es el uso de fármacos capaces de provocar una denervación. Tal es el caso de la capsaicina (Ver Figura 5).

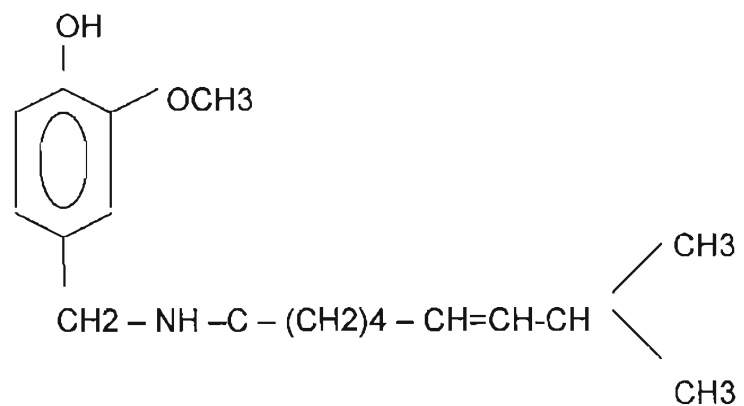


Figura 5. Representación de la estructura química de la capsaicina (Holzer, 1991).

La capsaicina es uno de los fármacos utilizados para provocar la destrucción de las fibras sensoriales. El efecto neurotóxico de la administración sistémica de capsaicina está restringido principalmente a las fibras aferentes no mielinizadas; y en menor grado a las neuronas mielinizadas (de tipo A). La capsaicina ejerce una acción neurotóxica sobre la neurona sensorial, lo que se acompaña de cambios funcionales, estructurales y degenerativos, los cuales explican los efectos a largo plazo de la acción del fármaco. La disminución en las concentraciones de péptidos es probablemente una consecuencia de la acción

neurotóxica de la capsaicina, pero esto no es la causa de la disfuncionalidad de la neurona (Holzer, 1991).

El mecanismo de acción de la capsaicina parece involucrar la interacción del fármaco con las membranas de las terminales nerviosas que contienen a la SP. Estas interacciones se establecen a través de enlaces covalentes. La disminución en la concentración de la SP está relacionada con las interacciones entre la capsaicina y los componentes membranales de las terminales nerviosas sensoriales. Estas interacciones provocan alteraciones en la capacidad de las terminales nerviosas para transportar factores neurotróficos. Uno de los factores que se ha postulado como candidato es el NGF esencial para el mantenimiento de la síntesis del péptido en el soma neural (Burks y col., 1985).

La capsaicina requiere de unirse a su receptor conocido con el nombre de VR1. Este receptor es una proteína de membrana que pertenece a la familia de los receptores que se enlazan a vanilloides. Este tipo de receptores han sido localizados en neuronas aferentes primarias en los segmentos cervical, torácico y lumbar de la médula espinal (Holzer, 1991; Szallasi y Blumberg, 1999; Wardle y col., 1997).

La unión de capsaicina al receptor provoca la apertura de un canal catiónico, lo cual produce un flujo predominantemente de calcio, lo cual provoca despolarización de la membrana. Al generarse un potencial de acción, éste se propaga a lo largo de la neurona y puede ser percibido por el SNC como comezón o dolor. Las neuronas sensibles a vanilloides utilizan como transmisores al glutamato, ATP y varios neuropéptidos.

La capsaicina provoca la liberación de neuropéptidos pro-inflamatorios de las terminales nerviosas sensibles, los que inician la cascada de eventos que participan en la inflamación. Los neuropéptidos incluyen a la SP y al CGRP (Holzer, 1991).

EFFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE DISTINTOS MODELOS ANIMALES.

ANIMAL NEONATO.

En la rata recién nacida una dosis subcutánea de 50 mg/Kg de capsaicina provoca la degeneración de las fibras aferentes primarias del tipo β que contienen SP como neuropéptido. Esta degeneración toma lugar 30 minutos después de la administración y es permanente (Fitzgerald, 1983; Mione y col., 1992), por lo que se piensa que estas fibras modulan su función indirectamente a través de la liberación de SP como un neuropéptido de sinapsis en neuronas autónomas (de tipo adrenérgico) (Gamse y col., 1981).

En ratas Wistar la administración neonatal de una sola dosis de capsaicina (50mg/Kg) provoca un incremento significativo en las conductas de rascado, acicalamiento y búsqueda por parte del animal. Los animales tratados con el neurofármaco presentaron ulceraciones en la región de la cabeza, el cuello y los hombros (Carrillo y col., 1994).

El tratamiento con capsaicina a ratas recién nacidas resulta en alteración de la función aferente de las neuronas sensoriales. La denervación producida por capsaicina se traduce en inhibición de la permeabilidad vascular, de la actividad del sistema inmune, así como inhibición de la actividad de los músculos cardíaco,

bronquial y visceral. El tratamiento neonatal con capsaicina resulta en alteraciones en la morfología de la córnea y el pulmón, además de provocar un incremento en las concentraciones de histamina y 5-hidroxitriptamina en la piel y el pulmón (Holzer, 1991).

En la ratona recién nacida el tratamiento con capsaicina resulta en degeneración de las neuronas aferentes pequeñas y de tamaño medio no mielinizadas cuyos somas se localizan en el ganglio de la raíz dorsal. Estos mismos resultados se observan cuando el tratamiento se realiza en la perra recién nacida. La administración de 50 mg/kg en el ganglio de la raíz dorsal en la ratona recién nacida, resulta en una rápida degeneración de los somas tipo β localizados en el ganglio de la raíz dorsal, así como la pérdida de axones sensoriales en la córnea.

El tratamiento con 70 mg/Kg de capsaicina en conejas recién nacidas no modifica la concentración de SP en la médula espinal y la córnea. En la gata recién nacida la administración de 200 mg/kg de capsaicina resulta en la degeneración de las neuronas de los plexos de Auerbach y Meissner, 24 a 72 horas después del tratamiento (Holzer, 1991).

ANIMAL ADULTO.

En la rata adulta, 60 días después de la administración de 35 a 300 mg/kg de capsaicina hay alteraciones de las mitocondrias en neuronas sensoriales tipo β , pero no en las tipo α o en las neuronas eferentes simpáticas. En el animal adulto los efectos de la capsaicina son dosis dependientes. La administración

subcutánea de 50 mg/Kg de capsaicina en ratas adultas resulta en una degeneración de los axones y las terminales axónicas en el uréter, el duodeno y la tráquea, lo cual puede observarse 24 horas después del tratamiento (Holzer, 1991).

En ratas la administración subcutánea o intraperitoneal de 50 a 125 mg/kg de capsaicina resulta en la depleción de SP de las terminales sensoriales del sistema nervioso periférico. La depleción de SP y somatostatina provocada por la administración de 125 mg/Kg de capsaicina en ratas adultas de la cepa Sprague-Dawley es menor que la causada por una dosis de 50 mg/kg de capsaicina en la rata recién nacida. En ratas de la cepa Wistar la denervación sensorial con capsaicina resulta en disminución de las concentraciones de SP y CGRP independientemente de la edad en la que el animal reciba el tratamiento (Holzer, 1991).

Según Holzer (1991), la administración sistémica de capsaicina en la cobaya adulta resulta en degeneración de las terminales axónicas de la región dorsal de la médula espinal, del tallo cerebral y de la periferia de los vasos sanguíneos. La administración de una sola dosis subcutánea de capsaicina (50mg/kg) en el mismo modelo animal resulta en la degeneración inmediata de las terminales sensoriales periféricas que contienen a la SP como neuropéptido. La depleción en las concentraciones de SP y los cambios ultraestructurales de los axones son apreciables hasta un año después del tratamiento con el neurotóxico. La pérdida de SP y del CGRP se ha detectado en todas las áreas que contienen fibras aferentes: ganglios sensoriales, piel, sistema cardiovascular, tracto respiratorio, sistema urogenital y ganglios simpáticos y parasimpáticos.

En la ratona adulta el tratamiento sistémico con 50 mg/kg de capsaicina resulta en la inhibición de la termonocicepción y la quimionocicepción.

En la gata adulta el tratamiento subcutáneo con 50 mg/kg resulta en la degeneración de las terminales axónicas localizadas en el tallo cerebral y en regiones de la médula espinal.

En la cerda adulta la administración de 50 mg/kg de capsaicina resulta en una depleción del 50-90% del CGRP y de la neurokinina presentes en la piel, el tracto respiratorio y el músculo esquelético.

Con base en los resultados antes mencionados podemos concluir que los efectos del tratamiento con capsaicina dependen de la edad del animal, así como de la cepa y la especie que se utilice como modelo experimental, lo que se resume a continuación:

- 1) El tratamiento en ratas recién nacidas resulta en la degeneración de la mayoría de las fibras aferentes delgadas.
- 2) El tratamiento sistémico en ratas adultas resulta en una acción neurotóxica en la mayoría de las fibras aferentes delgadas, pero no necesariamente causan degeneración del soma neural.
- 3) Existen diferencias cuantitativas en los resultados neurotóxicos de la capsaicina entre las diferentes cepas de ratas.
- 4) Hay diferencias pronunciadas en la sensibilidad de las neuronas sensoriales al tratamiento con capsaicina entre las diferentes especies de mamíferos. Los primates, perros, ratona y cobaya son muy sensibles a los efectos de la capsaicina, mientras que la coneja y el criceto son mucho menos sensibles.

EFFECTO DE LA CAPSAICINA SOBRE LAS FUNCIONES DEL OVARIO.

Para analizar la participación de la inervación sensorial en la regulación de las funciones del ovario, se ha utilizado a la capsaicina para provocar la destrucción de las fibras sensoriales.

Traurig y col. (1984) mostraron que la inyección sistémica del fármaco en la rata neonatal provoca disminución en el peso corporal y retraso en la edad de la apertura vaginal.

Trabajos de nuestro laboratorio muestran que la inyección de capsaicina en ratas recién nacidas resulta en una disminución en el número de ovocitos liberados al primer estro, sin cambios en la edad de apertura vaginal y disminución en el número de folículos pequeños presentes en los ovarios; tales efectos cambian cuando el fármaco se administra a los 3 días de vida del animal (Morán y col., 1998, 2003; Razo, 2000). En el modelo del animal hemicastrado a los 20 días de vida, el tratamiento con capsaicina resultó en una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de P_4 cuando el ovario derecho se mantenía *in situ*. Por otro lado, cuando la hemicastración fue realizada en animales de 28 días de edad, el grupo tratado con capsaicina y con el ovario derecho *in situ*, no mostró cambios en las concentraciones plasmáticas de progesterona, pero cuando el ovario derecho fue extirpado (ovario izquierdo *in situ*) el tratamiento con capsaicina resultó en una disminución significativa en las concentraciones plasmáticas de progesterona. En el modelo del animal hemicastrado a los 20 ó 28 días de edad y denervados con capsaicina al nacimiento, la hipertrofia y ovulación compensadora depende del día en que se lleva a cabo la hemiscastración así como del ovario

remanente (Apolonio y col., 2000; Morán y col., 2003). Estas evidencias permiten suponer que la información conducida por la inervación sensorial del ovario participa en la modulación de los procesos neuroendócrinos centrales y periféricos que culminan con la pubertad y con la respuesta compensadora (Morán y col., 2000, 2003).

En la rata adulta la administración de capsaicina disminuye la respuesta de lordosis y la proporción de hembras preñadas, como reflejo de una menor respuesta decidual por parte del endometrio (Nance y col., 1987). Con base en estos resultados se ha sugerido que durante la cópula se requiere de la información sensorial que se origina en el cervix y la vagina para que se pueda cerrar el circuito a nivel hipotalámico y llevar a cabo una respuesta decidual adecuada (Traurig y col., 1984 y 1988).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Existen fuertes evidencias a favor de la existencia de una vía neural de conexión entre el SNC y los ovarios, por lo que se ha establecido la hipótesis según la cual cada lado del hipotálamo recibiría información acerca de la función ovárica por dos vías: una hormonal y otra neural. El SNC regularía las funciones del ovario por intermedio de la liberación de la GnRH y una vía neural que llegaría a la gónada principalmente a través del NOS. El SNC recibiría información sobre la función del ovario por una vía hormonal (estrógenos, P₄, inhibina, activina) y posiblemente por una vía neural representada por fibras sensoriales que recogerían señales inmediatas en el propio ovario y las enviarían hacia el SNC.

Uno de los problemas más frecuentes para analizar la participación de la inervación sensorial en la regulación de las funciones del ovario es el diseño de un modelo experimental que permita distinguir entre los efectos neurales de otros como los humorales. El uso de la capsaicina tiene como ventaja ser un neurotóxico selectivo que destruye fibras sensoriales no mielinizadas. Es por esta razón que el presente trabajo tiene como objetivo analizar la participación de la información transmitida por la inervación sensorial en la regulación de las funciones del ovario a lo largo del ciclo estral en la rata adulta, ya que hasta el momento no existen reportes que indiquen la influencia del ambiente hormonal que caracterizan a cada uno de los días del ciclo estral, sobre la participación de la información sensorial en la regulación de las funciones del ovario tales como la ovulación y la esteroidogénesis.

El modelo experimental contempla el uso de animales intactos y hemicastrados a los que se les administró una dosis única de capsaicina y dos vías de administración: 1) el tratamiento sistémico (inyección subcutánea (sc) del neurotóxico) y 2) el tratamiento local (inyección intrabursal del fármaco), con lo que se pretende asegurar que la capsaicina destruya exclusivamente las fibras sensoriales que llegan al ovario.

HIPÓTESIS

El tratamiento con capsaicina en ratas adultas destruirá las fibras sensoriales que salen del ovario, lo que dará como resultado cambios en la información que el SNC recibe de las gónadas y se traducirá en modificaciones de las funciones del ovario tales como la ovulación y la secreción de hormonas ováricas.

OBJETIVO GENERAL

Estudiar en la rata adulta, la participación de las señales sensoriales sobre los mecanismos neuroendocrinos que regulan la función ovárica.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

Experimento 1. Tratamiento Sistémico.

1. Analizar la participación de la información sensorial en el establecimiento del ciclo estral en la rata adulta cíclica.
2. Analizar la participación de la información sensorial sobre la tasa ovulatoria y el número de ovocitos liberados.
3. Analizar la participación de la información sensorial en la secreción de hormonas esteroideas.
4. Analizar la participación de la información sensorial en el peso corporal, de los ovarios y del útero de ratas adultas cíclicas.
5. Analizar la participación de la información sensorial en la concentración de noradrenalina ovárica.
6. Analizar si la denervación sensorial con capsaicina provoca cambios en la secreción de hormonas esteroideas a lo largo del ciclo estral.

Experimento 2. Tratamiento local.

1. Analizar el efecto de la administración intrabursal de capsaicina en el establecimiento del ciclo estral en la rata adulta cíclica.
2. Analizar los efectos de la administración intrabursal de capsaicina sobre la tasa de ovulación y el número de ovocitos liberados.
3. Analizar los efectos de la administración intrabursal de capsaicina en la secreción de hormonas esteroideas.
4. Analizar los efectos de la administración intrabursal de capsaicina en el peso corporal, la masa ovarica y el peso del útero de ratas adultas cíclicas.
5. Analizar los efectos de la administración intrabursal de capsaicina sobre las concentraciones de noradrenalina ovárica.

Experimento 3. Tratamiento Sistémico, la rata adulta hemicastrada como modelo de estudio.

1. Analizar la participación de la inervación sensorial en el establecimiento de la hipertrofia ovárica compensadora (HOC) .
2. Analizar la participación de la inervación sensorial sobre la ovulación compensadora (OC) .
3. Analizar la participación de la inervación sensorial en la secreción de hormonas esteroideas en la rata adulta hemicastrada.
4. Analizar la participación de la inervación sensorial en el peso de los ovarios y del útero de ratas adultas cíclicas hemicastradas.

METODOLOGÍA.

Todos los protocolos experimentales descritos a continuación fueron a probados por la Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, en lo que se refiere al uso y cuidado de animales de laboratorio.

Se utilizaron ratas hembras adultas de la cepa CIIZ-V (230-260 g) las cuales se mantuvieron en condiciones controladas de luz-oscuridad (luces encendidas de 06.00 a 18.00 h), con libre acceso al agua y alimento. Solo se utilizaron animales que presentaron al menos tres ciclos consecutivos previos de 4 días de duración.

La inyección del fármaco se realizó entre las 9:00 y 10:00 hrs. En todos los casos los animales fueron anestesiados con éter antes de la inyección.

TRATAMIENTO SISTÉMICO.

Con el fin de evaluar si la información sensorial del ovario participa en la regulación del proceso de la función ovárica y para analizar si dicha participación se modifica a lo largo del ciclo estral, se evaluaron los efectos de la denervación sensorial farmacológica por el tratamiento sistémico con capsaicina. Las ratas fueron inyectadas una sola vez con 50 mg/Kg de capsaicina sc, disuelta en vehículo (10% etanol absoluto, 10% de Tween-80 y 80% de solución salina al 0.9%).

TRATAMIENTO LOCAL.

En los animales anestesiados se realizaron dos pequeñas incisiones en la región dorsal, y se expusieron ambos ovarios a través de la incisión respectiva. La

inyección de 12 ng en 50 μ l de capsaicina se realizó en la bursa de cada ovario, con ayuda de una jeringa con aguja del número 29, Los ovarios fueron retornados a la cavidad abdominal y se suturó la herida.

Después del tratamiento respectivo, se monitoreó diariamente el ciclo estral, los animales fueron sacrificados la mañana del día del estro, después de tres ciclos estrales consecutivos de cuatro días de duración. Este es el tiempo en que se completa un ciclo de desarrollo folicular.

PRUEBA DE ANALGESIA.

Antes de la autopsia los animales fueron sometidos a una prueba de analgesia que consistió en pinchar la extremidad posterior derecha con una pinza de mosquito y observar el movimiento de retirada.

PROCEDIMIENTO DE AUTOPSIA.

Los animales fueron sacrificados por decapitación. Se colectó la sangre del tronco y se dejó coagular durante 30 minutos, posteriormente se centrifugó a 3500 rpm durante 15 minutos. Se separó el suero y se almacenó a -20°C hasta el momento de la cuantificación de 17β -estradiol, progesterona y testosterona por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, mediante reactivos comerciales (Diagnostic Products. Los Angeles CA, USA). Los coeficientes de variación intra- e inter-ensayo fueron 2.1% y 5.6% para progesterona, de 6.0% y 7.1% para estradiol, y de 9.65% y 10.2% para testosterona.

A la autopsia, se disecaron los oviductos para detectar la presencia de ovocitos, los cuales fueron contabilizados con ayuda de un microscopio estereoscópico. De igual forma, se disecaron y pesaron en balanza de precisión los ovarios y el útero.

El ovario izquierdo de los grupos experimentales fue procesado para determinar la concentración de noradrenalina ovárica. En breve, los ovarios fueron homogenizados en 300 μ l de ácido perclórico 0.1 M. y se midió la concentración de noradrenalina por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), siguiendo el procedimiento descrito por Chávez y Domínguez (1994).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El número de ovocitos liberados fue analizado por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de U de Mann-Whitney. El peso de los ovarios, el útero y las concentraciones de noradrenalina, estradiol, progesterona, y testosterona, se analizaron por una prueba de análisis multifactorial (ANDEVA), seguida por la prueba de Tukey. Cuando se compararon dos medias, se utilizó la prueba de "t" de Student. La tasa ovulatoria (número de animales ovulantes / número de animales tratados) se analizó por la prueba de Ji cuadrada. En todos los casos se consideró como diferencias estadísticamente significativas una probabilidad menor al 5%.

Experimento 1

Resultados

Tratamiento Sistémico

Con el fin de analizar si la información sensorial del ovario participa en la regulación de la función de la gónada y el establecimiento del ciclo estral, y si ésta participación varía a lo largo del ciclo estral, se evaluaron los efectos de la denervación sensorial farmacológica inducida con capsaicina. Para ello se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

1. Grupo testigo absoluto. Sin tratamiento.
2. Grupo tratado con capsaicina. En el día del diestro 1, del diestro 2, del proestro o del estro, las ratas fueron inyectadas una sola vez con 50 mg/Kg de capsaicina subcutánea (sc), disuelta en vehículo.
3. Grupo testigo inyectado con vehículo. Los animales fueron inyectados en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro con 0.03 ml del vehículo.

En estos animales se continuó con la toma de frotis vaginales y fueron sacrificados en la mañana del día del estro esperado, después de tres ciclos consecutivos de 4 días de duración.

Objetivo 1. Analizar la participación de la información sensorial en el establecimiento del ciclo estral, el porcentaje de animales ovulantes y el número de ovocitos liberados en la rata adulta cíclica.

Las ratas tratadas con capsaicina mostraron ulceraciones de la piel en la región de la cabeza, el cuello y la región de la cintura escapular, y una reducción en la respuesta de retirada de la pata ante un estímulo mecánico.

En las ratas adultas tratadas con capsaicina o vehículo no se presentaron modificaciones en el ciclo estral al compararse con el grupo testigo.

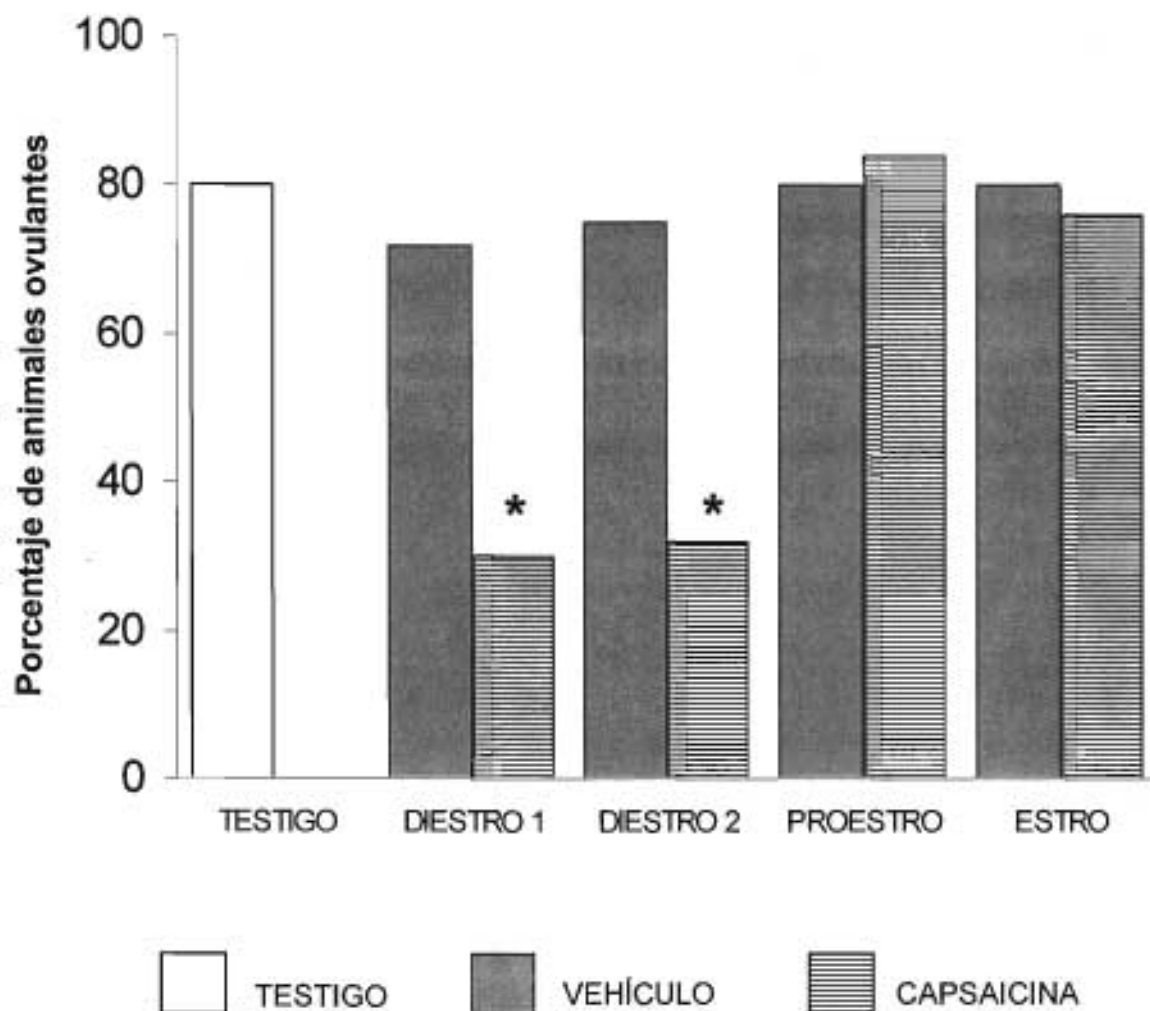
En los animales tratados con capsaicina o vehículo no se modificó el número de ovocitos liberados por animal ovulante (Tabla 1).

La administración de capsaicina o vehículo en el día del proestro o del estro no modificó el porcentaje de animales ovulantes (Figura 6). En cambio, cuando el tratamiento con capsaicina se realizó en el día del diestro 1 o del diestro 2, se observó una disminución significativa en el porcentaje de animales que ovularon (Figura 6).

Tabla 1. Media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados en ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) o vehículo (VEH) en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.

GRUPO	n	Número de ovocitos liberados		
		Ovario Derecho	Ovario Izquierdo	TOTAL
TESTIGO	25	4.9 \pm 0.5	5.2 \pm 0.3	10.2 \pm 0.6
VEH-DIESTRO 1	25	5.6 \pm 0.6	5.8 \pm 0.7	11.2 \pm 0.9
CAP-DIESTRO 1	20	5.3 \pm 0.4	5.1 \pm 0.3	10.5 \pm 0.6
VEH-DIESTRO 2	20	5.9 \pm 0.6	5.2 \pm 0.9	11 \pm 0.9
CAP-DIESTRO 2	22	5.8 \pm 0.6	4.9 \pm 0.6	10.7 \pm 0.9
VEH-PROESTRO	25	5.1 \pm 0.8	4.9 \pm 0.8	10.1 \pm 1.1
CAP-PROESTRO	25	5.8 \pm 0.6	4.7 \pm 0.6	10.1 \pm 0.9
VEH-ESTRO	25	4.8 \pm 0.6	4.9 \pm 0.4	10.2 \pm 0.9
CAP-ESTRO	25	5.0 \pm 0.4	4.8 \pm 0.3	9.7 \pm 0.6

Figura 6. Porcentaje de animales ovulantes de ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) o vehículo (VEH) en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas el día del estro tres ciclos estrales después del tratamiento.



* $p < 0.05$ vs grupo testigo. Ji cuadrada

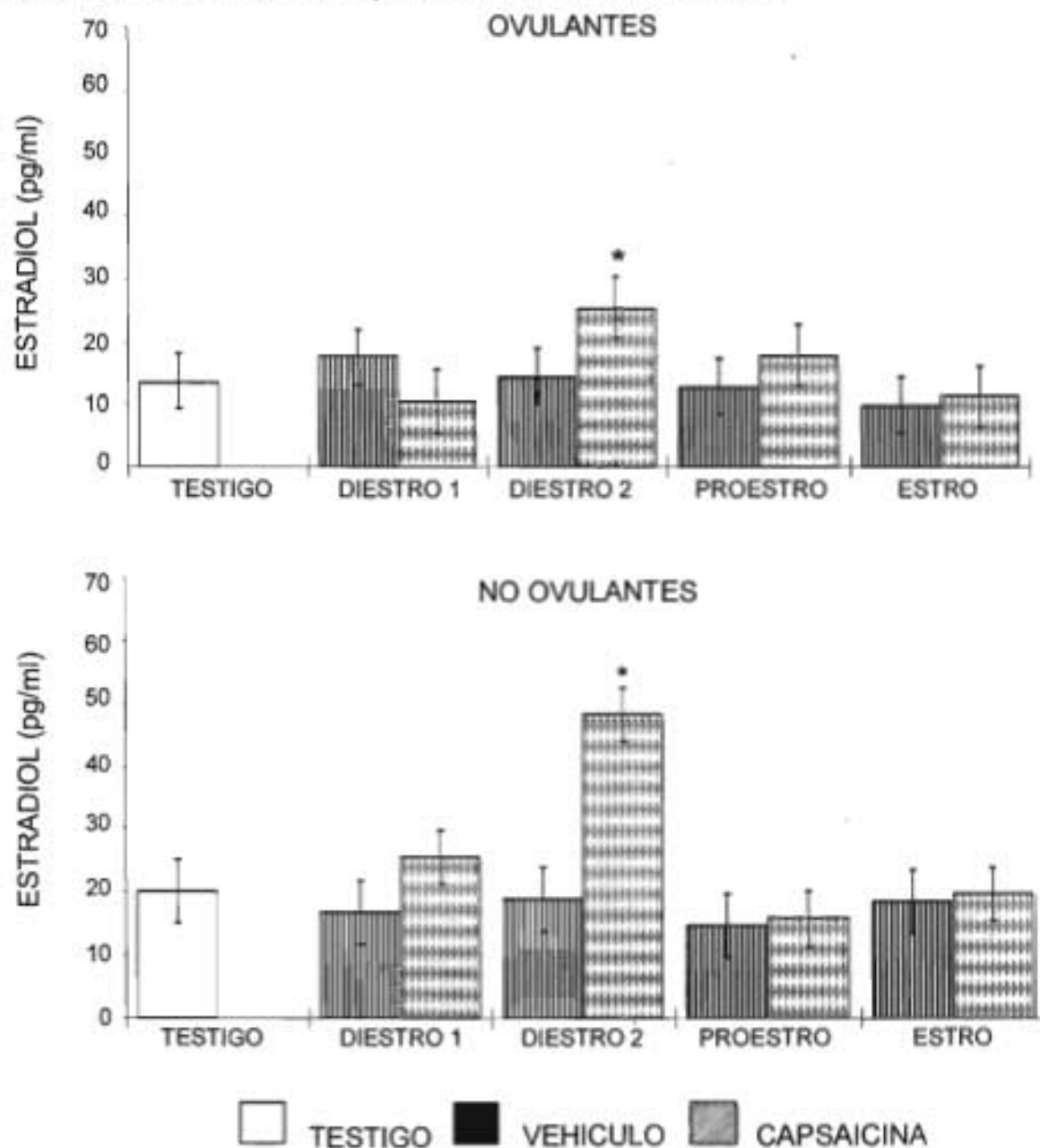
Objetivo 2. Analizar la participación de la información sensorial en la regulación de la secreción de hormonas esteroideas.

El tratamiento sistémico con capsaicina en el día del diestro 2 resultó en un incremento significativo en las concentraciones séricas de E_2 tanto en los animales ovulantes como en los no ovulantes (Figura 7). Las concentraciones séricas de esta hormona no se modificaron por la aplicación sistémica del vehículo en los mismos días del ciclo estral. Las concentraciones séricas de E_2 en los animales tratados con capsaicina en el día del proestro, estro o del diestro 1 no se modificaron con respecto al grupo testigo absoluto y a su respectivo grupo tratado con vehículo (Figura 7).

En comparación con el grupo testigo absoluto las concentraciones séricas de P_4 se incrementaron en el grupo tratado con capsaicina en el día del diestro 2 tanto para animales ovulantes como no ovulantes (Tabla 2), sin que se observaran modificaciones en la secreción de la hormona en los otros grupos experimentales.

El tratamiento con capsaicina en el día del diestro 1, diestro 2 o estro resultó en un incremento significativo en las concentraciones séricas de T al compararse con su respectivo grupo tratado con vehículo (Tabla 3).

Figura 7. Media \pm e.e.m. de las concentraciones séricas de estradiol en ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) o vehículo (VEH) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.



* $p < 0.01$ vs. Grupo Testigo y grupo tratado con Vehículo en el mismo día del ciclo estral. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Tabla 2. Media±e.e.m. de las concentraciones séricas de progesterona (P₄) en ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) o vehículo (VEH) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.

GRUPO	Animales ovulantes		Animales no ovulantes	
	n	P ₄ (ng/ml)	n	P ₄ (ng/ml)
TESTIGO	20	5.2±0.9	5	4.9±0.8
VEH-DIESTRO 1	18	7.9±2.3	7	7.9±2.1
CAP-DIESTRO 1	6	6.1±1	14	7.4±1.6
VEH-DIESTRO 2	15	6.9±1.8	5	5.3±1.1
CAP-DIESTRO 2	7	8.8±1.4*	15	12.3±1.1*#♦
VEH-PROESTRO	20	5.5±0.9	5	6.6±0.8
CAP-PROESTRO	21	5.3±1.3	4	5.8±1.2
VEH-ESTRO	20	7.8±1.9	5	4.2±1.5
CAP-ESTRO	19	6.4±1.3	6	5.2±0.9

*p<0.01 vs grupo testigo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

#p<0.05 vs. Grupo VEH-DIESTRO 2. Prueba "t" de Student.

♦p<0.05 vs. Grupo CAP-DIESTRO 2 animales ovulantes. Prueba "t" de Student.

Tabla 3. Media±e.e.m. de las concentraciones séricas de testosterona (T) en ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) o vehículo (VEH) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.

GRUPO	Animales ovulantes		Animales no ovulantes	
	n	T(pg/ml)	n	T(pg/ml)
TESTIGO	20	80.3±22.4	5	70.2±18.5
VEH-DIESTRO 1	18	62±24.5	7	62.5±8.8
CAP-DIESTRO 1	6	127.7±39.5*	14	110.8±23.1*
VEH-DIESTRO 2	15	68.7±26.7	5	50.2±11.5
CAP-DIESTRO 2	7	126.5±10.5*	15	99.7±21.1*
VEH-PROESTRO	20	80.9±21.6	5	89.9±20.3
CAP-PROESTRO	21	122.5±31.5	4	89.8±19.3
VEH-ESTRO	20	49.1±21.6	5	58.3±15.1
CAP-ESTRO	19	125.8±41*	6	100.1±22.1*

*p<0.01 vs respectivo grupo tratado con vehículo. Prueba "t" de Student.

Objetivo 3. Analizar los efectos de la deservación sensorial sobre el peso corporal, de los ovarios y del útero de ratas adultas cíclicas.

El tratamiento sistémico con el neurotóxico o con el vehículo no afectó el peso corporal (Tabla 4), ni el peso de los ovarios tanto de los animales que ovularon como los que no ovularon (Tabla 5). El tratamiento con capsaicina no modificó el peso del útero en los animales ovulantes, pero el tratamiento con capsaicina en el día del diestro 2 resultó en una disminución en el peso del útero de los animales que no ovularon (Figura 8).

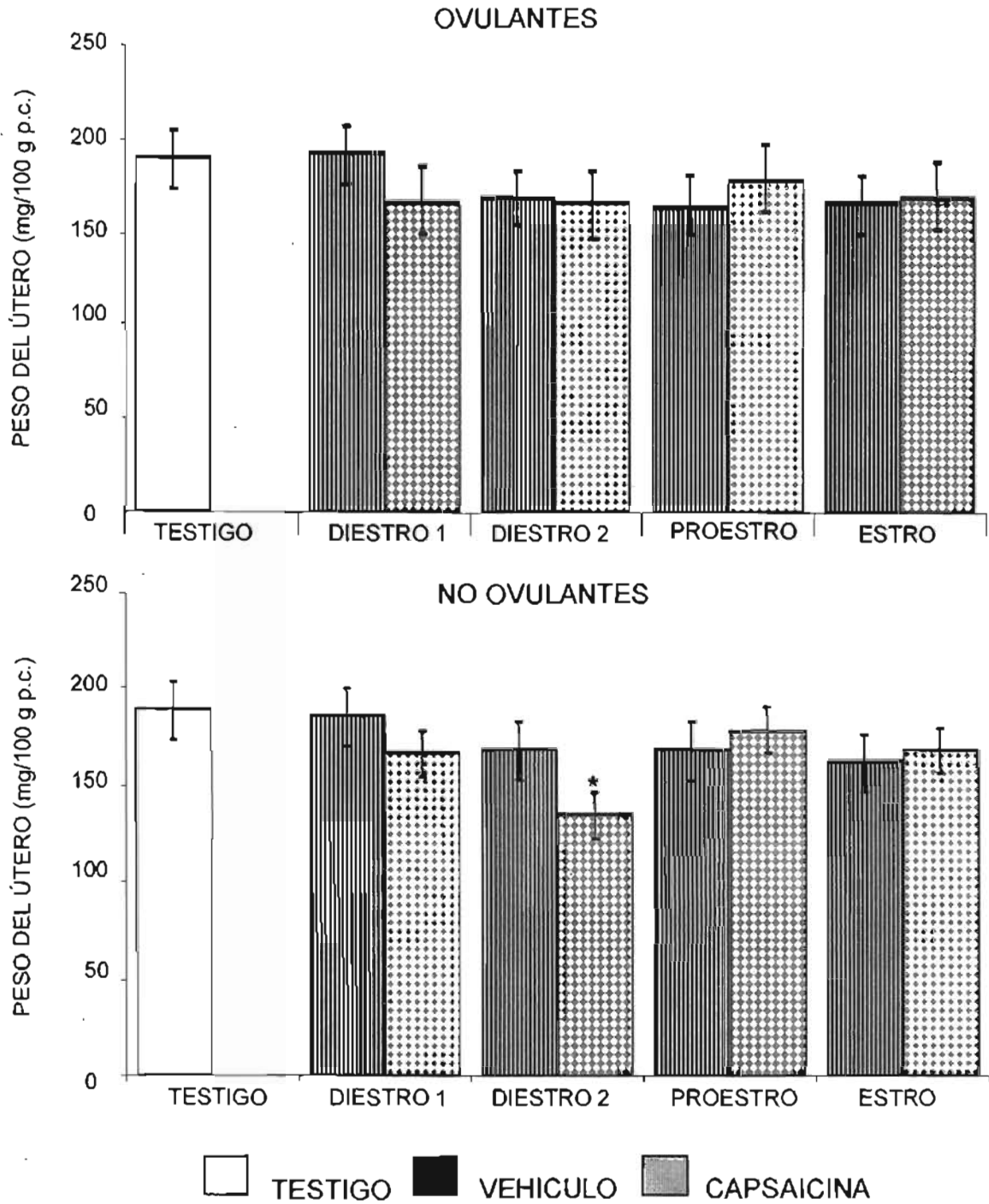
Tabla 4. Media \pm e.e.m del peso corporal (g) de ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) o vehículo (VEH) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.

GRUPO	Animales ovulantes		Animales no ovulantes	
	n	Peso Corporal	n	Peso Corporal
TESTIGO	20	259.3 \pm 8.5	5	255.1 \pm 9.4
VEH-DIESTRO 1	18	243.2 \pm 10.2	7	261.2 \pm 12.3
CAP-DIESTRO 1	6	259.8 \pm 7.8	14	263.2 \pm 10.5
VEH-DIESTRO 2	15	262.3 \pm 9.6	5	251.8 \pm 6.4
CAP-DIESTRO 2	7	252.3 \pm 4.8	15	249.6 \pm 8.9
VEH-PROESTRO	20	248.9 \pm 11.8	5	253.4 \pm 8.1
CAP-PROESTRO	21	249.3 \pm 8.3	4	255.8 \pm 8.2
VEH-ESTRO	20	258.6 \pm 8.6	5	247.9 \pm 9.3
CAP-ESTRO	19	253.2 \pm 4.8	6	249.8 \pm 8.6

Tabla 5. Media \pm e.e.m. de la masa ovárica en ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) o vehículo (VEH) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.

GRUPO	Animales ovulantes		Animales no ovulantes	
	n	Masa ovárica	n	Masa ovárica
TESTIGO	20	22.4 \pm 1.1	5	21.8 \pm 1.3
VEH-DIESTRO 1	18	23.1 \pm 2.1	7	22.1 \pm 1.8
CAP-DIESTRO 1	6	22.2 \pm 1.5	14	21.6 \pm 1.4
VEH-DIESTRO 2	15	21.9 \pm 1.2	5	22.6 \pm 1.3
CAP-DIESTRO 2	7	20.9 \pm 1.6	15	22.1 \pm 1.4
VEH-PROESTRO	20	22.8 \pm 1	5	21.4 \pm 1.5
CAP-PROESTRO	21	21.1 \pm 0.8	4	21.8 \pm 1.1
VEH-ESTRO	20	21.2 \pm 1.4	5	21.9 \pm 1.5
CAP-ESTRO	19	21.5 \pm 1.2	6	22.5 \pm 1.8

Figura 8. Media \pm e.e.m del peso del útero (mg/100 g de peso corporal) de ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) o vehículo (VEH) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.



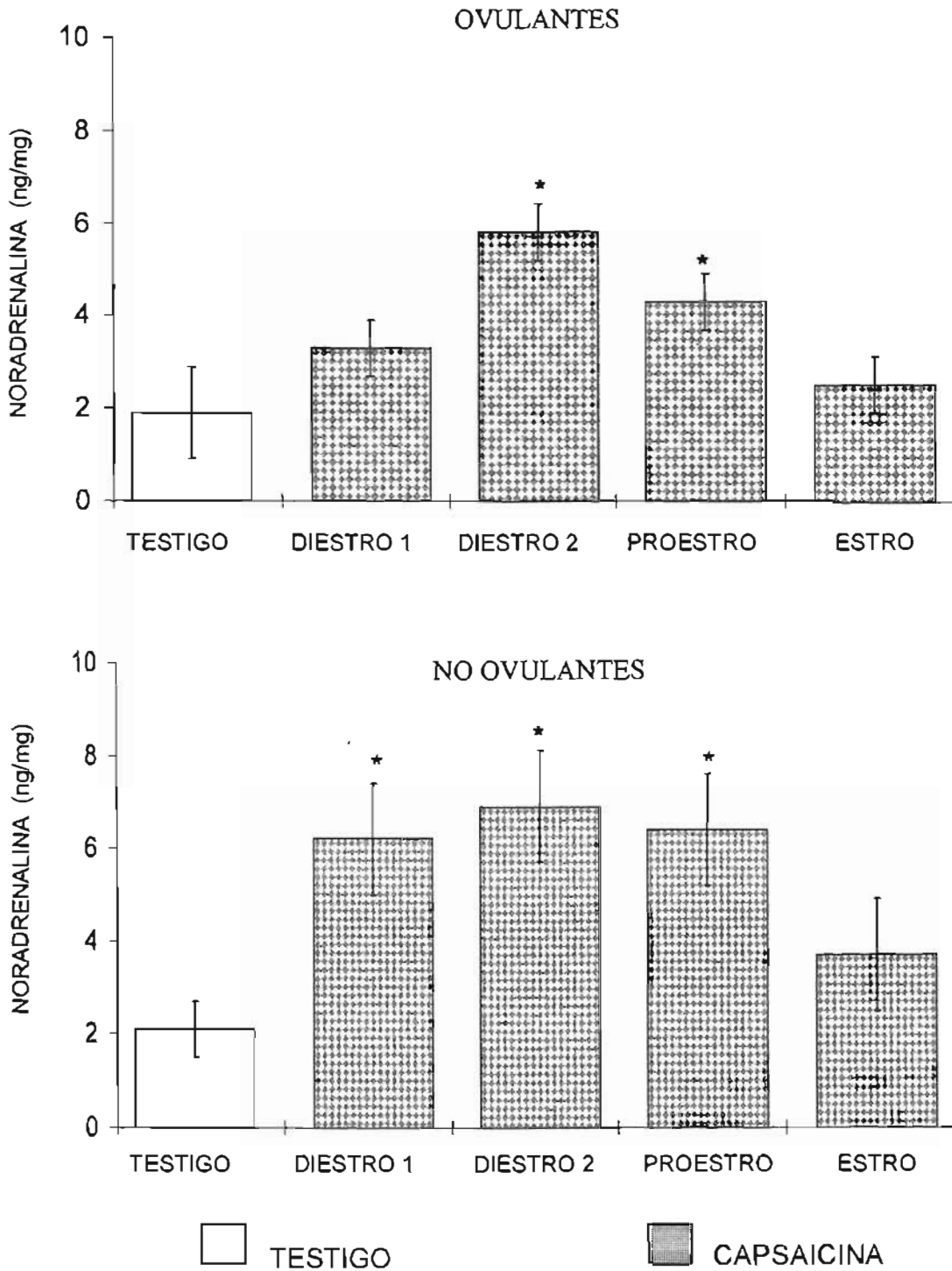
* $p < 0.05$ vs. Grupo Testigo Absoluto y Grupo tratado con vehículo en el mismo día del ciclo estral. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Objetivo 4. Analizar los efectos de la denervación sensorial con capsaicina sobre la concentración de noradrenalina ovárica

En las ratas adultas, el tratamiento con una sola dosis de capsaicina resultó en un incremento en las concentraciones de noradrenalina en aquellos grupos de animales inyectados en el día del diestro 2 o del proestro y que ovularon. La concentración ovárica de noradrenalina no se modificó en los grupos tratados en el día del estro o del diestro 1 (Figura 9).

En los animales tratados con el neurotóxico en el día del estro y que no ovularon, las concentraciones ováricas de noradrenalina no se modificaron al compararse con el grupo testigo. Al compararse con el grupo testigo el tratamiento con capsaicina en el día del diestro 1, diestro 2 o del proestro resultó en un incremento en las concentraciones de noradrenalina ovárica (Figura 9).

Figura 9. Media \pm e.e.m de las concentraciones ováricas de noradrenalina (ng/mg de tejido) en los ovarios de ratas adultas testigo, tratadas con capsaicina (CAP) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.



*p < 0.01 vs. Grupo Testigo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Objetivo 5. Analizar si la denervación sensorial con capsaicina provoca cambios en la secreción de hormonas esteroideas a lo largo del ciclo estral.

Para llevar a cabo este objetivo se realizó el siguiente diseño experimental:

1. Grupo testigo absoluto. Sin tratamiento.
2. Grupo tratado con capsaicina. En el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; las ratas fueron inyectadas una sola vez con 50 mg/Kg de capsaicina sc, disuelta en vehículo (volumen 0.03 ml), los animales se sacrificaron en la mañana de cada uno de los días del ciclo estral, después de tres ciclos consecutivos de 4 días de duración (Tabla 6).
3. Grupo testigo inyectado con vehículo. Los animales fueron inyectados en cada uno de los días del ciclo estral con 0.03 ml del vehículo. Se sacrificaron en la mañana de cada uno de los días del ciclo estral, después de tres ciclos consecutivos de 4 días de duración (Tabla 6).

Tabla 6. Distribución de animales

Grupo	Día de la autopsia			
	ESTRO	DIESTRO 1	DIESTRO 2	PROESTRO
Testigo Absoluto	n=20	n=12	n=12	n=12
<i>Día de administración</i>				
<i>Capsaicina</i>				
Diestro 1	n=6	n=12	n=12	n=10
Diestro 2	n=7	n=10	n=11	n=10
Proestro	n=21	n=12	n=12	n=12
Estro	n=19	n=10	n=11	n=10
<i>Vehículo</i>				
Diestro 1	n=18	n=12	n=12	n=12
Diestro 2	n=15	n=11	n=10	n=11
Proestro	n=20	n=12	n=12	n=12
Estro	n=20	n=12	n=11	n=10

Al compararse con el testigo absoluto se observó que el tratamiento sistémico con el vehículo no afectó las concentraciones séricas de estradiol (Tabla 7) y progesterona (Tabla 8).

Tabla 7. Media±e.e.m. de las concentraciones séricas de estradiol (pg/ml) en ratas adultas testigo o tratadas con vehículo (VEH) en el día del diestro 1, diestro2, proestro o estro y sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral.

GRUPO	Día del sacrificio			
	Diestro 1	Diestro 2	Proestro	Estro
Testigo	6.1±3.6	19.4±3.9	28.8±6	13.7±2.5
Día de la administración				
VEH-D1	13.1±4.7	13.1±3.1	23.1±5.1	17.6±4.8
VEH-D2	7.9±4.7	19.8±4.2	25.7±3.2	14.5±4.1
VEH-P	11.4±1.7	12.5±4.9	30.9±2.9	10.8±2.5
VEH-E	13.7±5.3	18.1±1.7	28.8±5	9.8±3.8

Tabla 8. Media±e.e.m. de las concentraciones séricas de progesterona (ng/ml) en ratas adultas testigo o tratadas con vehículo (VEH) en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro y sacrificadas en la mañana de cada uno de los días del ciclo estral.

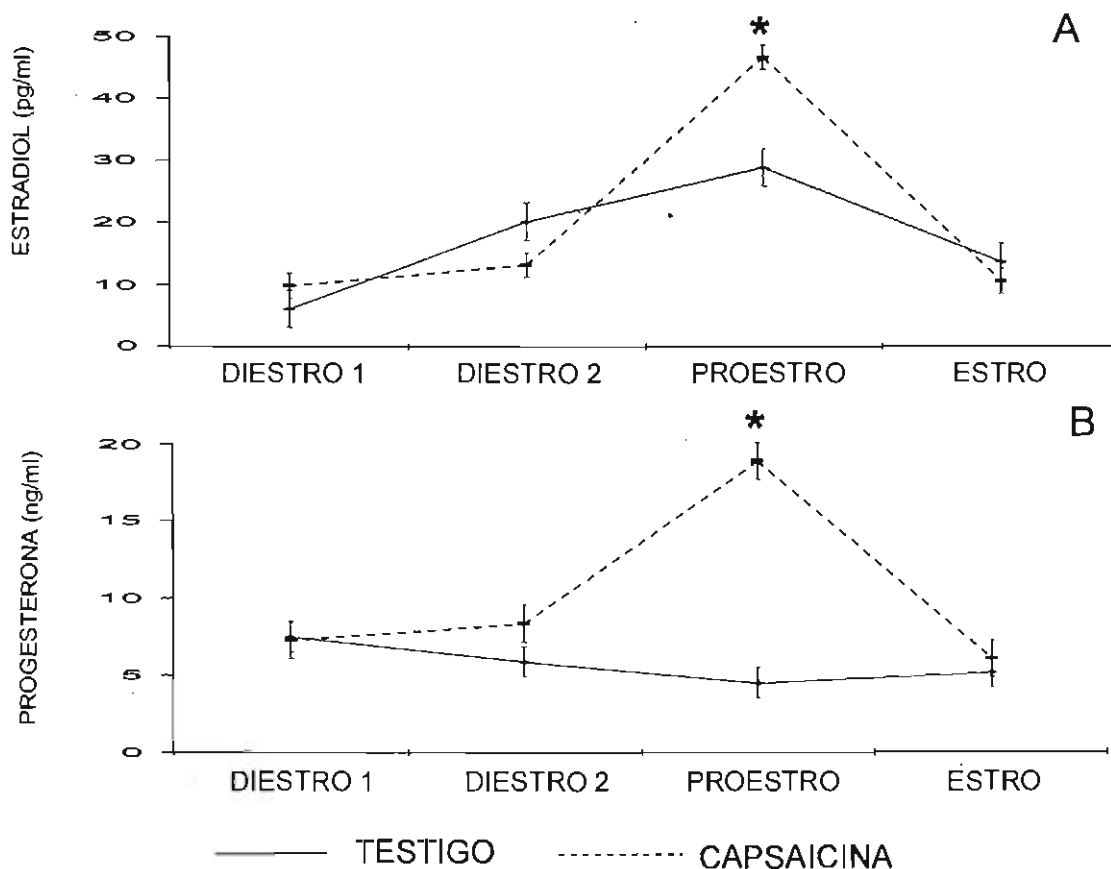
GRUPO	Día del sacrificio			
	Diestro 1	Diestro 2	Proestro	Estro
Testigo	7.5±1.9	5.9±1.5	4.5±1.1	5.2±0.9
Día de la administración				
VEH-D1	10.2±2.7	3.7±0.9	4.3±4.7	7.9±2.3
VEH-D2	6.9±1.8	5.2±1.8	6.5±1.5	6.9±1.8
VEH-P	5.5±0.9	4.9±1.1	5.8±2.7	5.5±0.9
VEH-E	7.4±1.7	5.1±1.5	5.6±2.1	7.8±1.9

Concentraciones séricas de estradiol y progesterona de animales adultos tratados con capsaicina en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro y sacrificados en la mañana de cada uno de los días del ciclo estral.

Capsaicina en el diestro 1.

En comparación con el grupo testigo, el tratamiento con capsaicina en el día del diestro 1 resultó en un incremento significativo en las concentraciones séricas de estradiol y progesterona en los animales sacrificados en el día del proestro. No se observaron cambios en las concentraciones séricas de la hormona en los animales sacrificados en el resto de los días del ciclo estral (Figura 10A y 10B).

Figura 10. Media±e.e.m. de las concentraciones séricas de estradiol y progesterona en ratas adultas testigo o tratadas con capsaicina (CAP) en el día del diestro 1 y sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral.



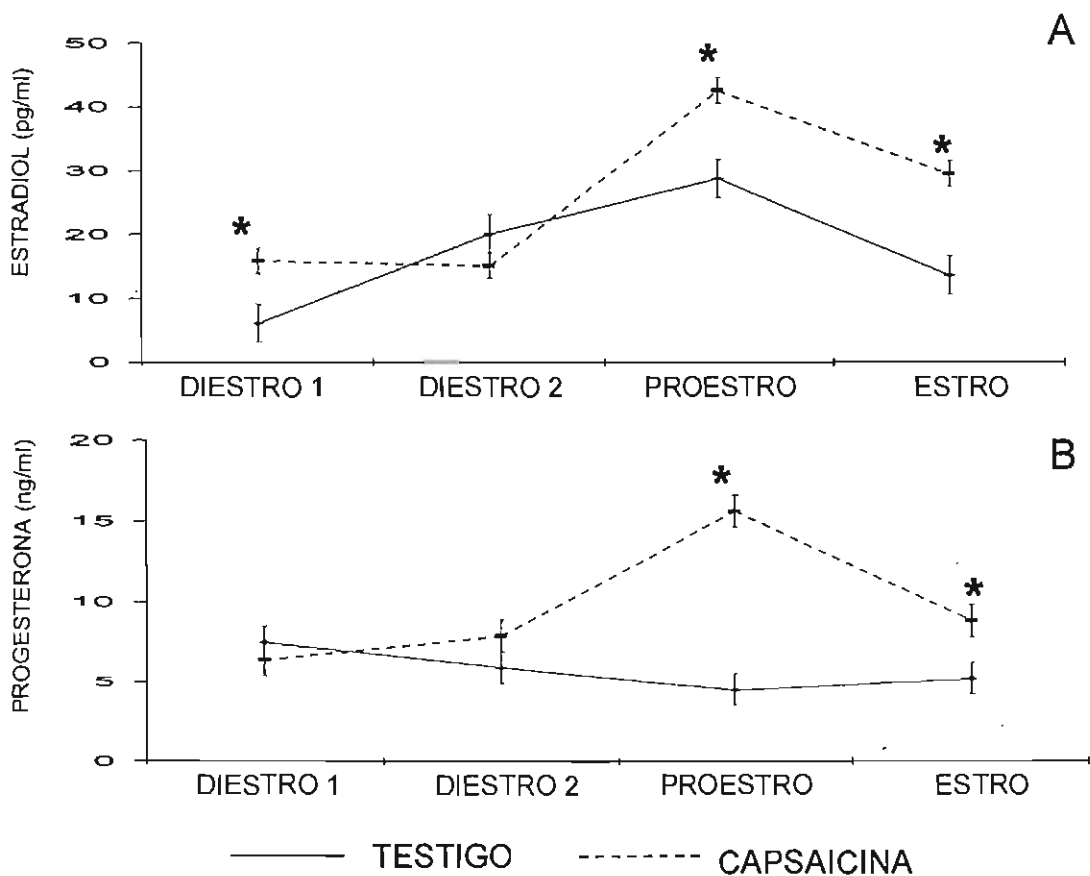
*p<0.01 vs. Grupo Testigo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Capsaicina en el diestro 2.

El tratamiento con capsaicina en el día del diestro 2 resultó en un incremento significativo en la concentración sérica de estradiol medida en el día del proestro, esto y diestro 1 al compararse con el grupo testigo absoluto sacrificado en esos mismos días del ciclo (Figura 11A).

El tratamiento con capsaicina en el día del diestro 2 resultó en un incremento significativo en las concentraciones séricas de progesterona medidas en el día del proestro y esto (Figura 11B).

Figura 11. Media \pm e.e.m. de las concentraciones séricas de E₂ y P₄ en ratas adultas testigo o tratadas con capsaicina (CAP) en el día del diestro 2 y sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral.



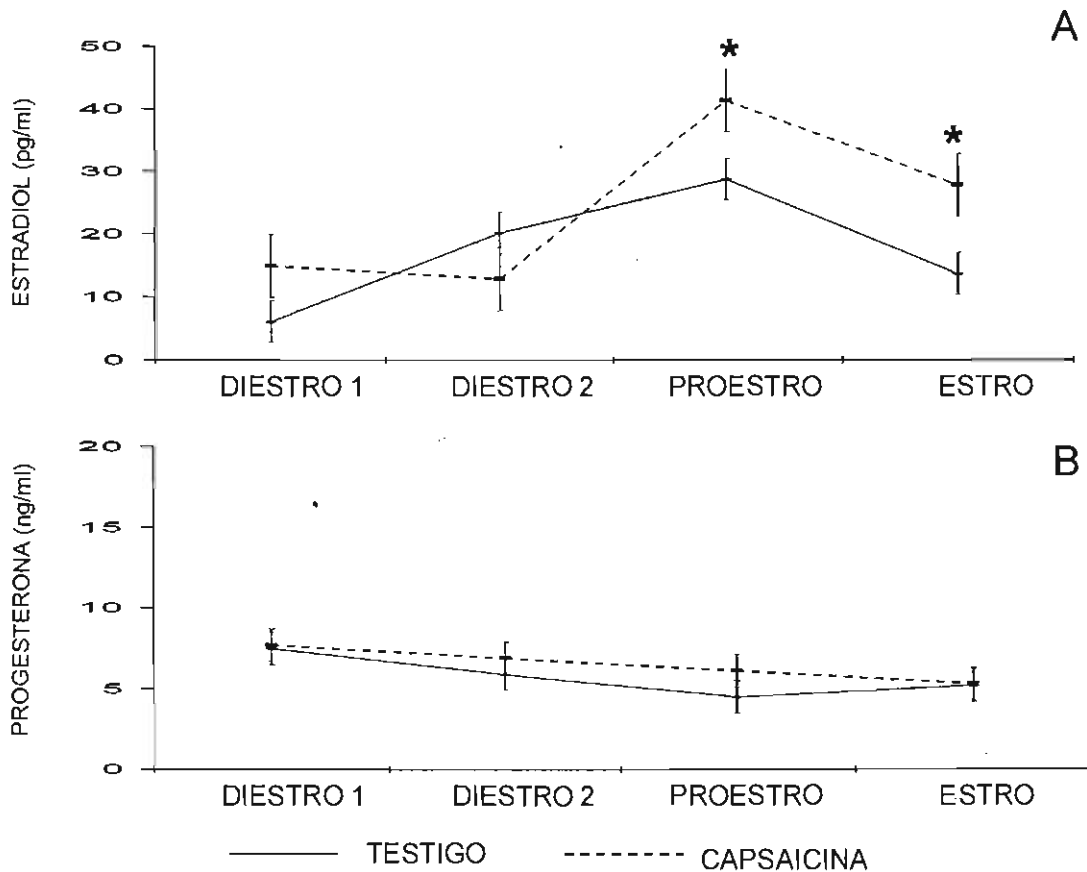
*p < 0.01 vs. Grupo Testigo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Capsaicina en el proestro.

El tratamiento sistémico con capsaicina en el día del proestro resultó en un incremento significativo en las concentraciones séricas de estradiol medidas en el día del proestro y estro al compararse con su respectivo grupo testigo absoluto (Figura 12A).

El tratamiento sistémico con capsaicina en el día del proestro no modificó las concentraciones séricas de progesterona a lo largo del ciclo estral (Figura 12B).

Figura 12. Media \pm e.m. de las concentraciones séricas de E₂ y P₄ en ratas adultas testigo o tratadas con capsaicina (CAP) en el día del proestro y sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral.



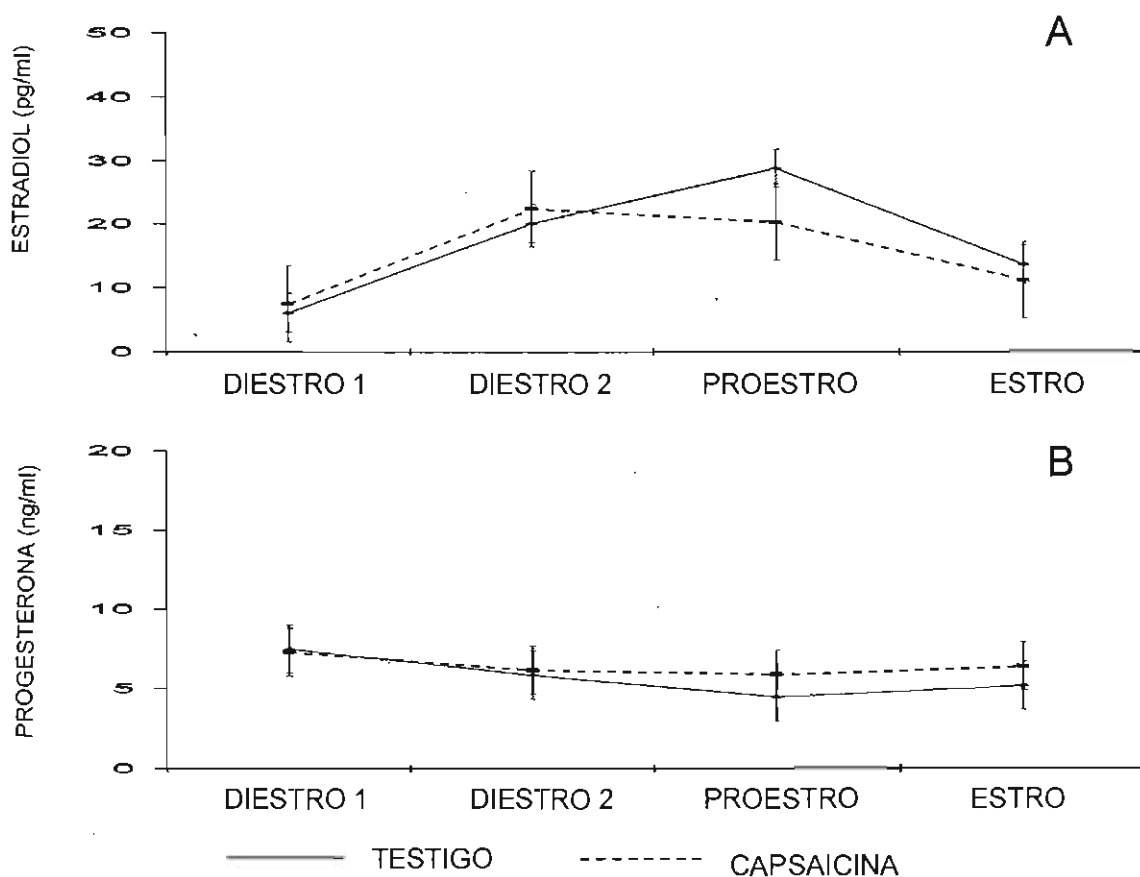
* $p < 0.01$ vs. Grupo Testigo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Capsaicina en el estro.

El tratamiento sistémico con capsaicina en el día del estro no modificó las concentraciones séricas de estradiol a lo largo del ciclo estral (Figura 13A).

Las concentraciones séricas de progesterona medida en cada uno de los días del ciclo estral no se modificaron al compararse con el grupo testigo absoluto (Figura 13B).

Figura 13. Media \pm e.e.m. de las concentraciones séricas de E₂ y P₄ en ratas adultas testigo o tratadas con capsaicina en el día del estro y sacrificadas en cada uno de los días del ciclo estral.



Discusión

Las lesiones observadas en los animales denervados (presencia de ulceraciones de la piel en la región de la cabeza, el cuello y la cintura escapular), así como la disminución en la respuesta de retirada de la pata ante un estímulo mecánico, concuerdan con lo reportado por otros investigadores, quienes analizaron en la rata, los efectos producidos por el tratamiento con capsaicina (Jancsó y col., 1977; Carrillo y col., 1994), lo que nos lleva a concluir que en este trabajo el tratamiento sistémico con capsaicina resultó en daño de las fibras sensoriales.

Nance y colaboradores (1987) mostraron que la administración intratecal de capsaicina en la rata adulta no modifica el ciclo estral, lo que concuerda con lo observado en este estudio ya que la administración sistémica con capsaicina no alteró la ciclicidad estral del animal. Por otro lado, los efectos del tratamiento con capsaicina sobre el ciclo estral difieren de los observados en animales con sección bilateral del nervio vago, donde se muestra que la intervención quirúrgica resulta en alteraciones en el ciclo estral (Burden, 1981). Estas diferencias pueden deberse a que:

- 1) El tratamiento con el neurotóxico afecta principalmente a las fibras aferentes no mielinizadas y en menor grado a las neuronas mielinizadas (de tipo α), mientras que el tratamiento quirúrgico elimina todas las fibras que transcurren por el nervio, por lo que en este último caso lo que se observa es la respuesta del sistema a la falta de diferentes tipos de información.

- 2) El intervalo que existe entre la sección y la autopsia, y entre la inyección

del fármaco y la autopsia.

3) En nuestro estudio hemos observado que existe un incremento en la concentración de NA ovárica (excepto cuando el tratamiento se lleva a cabo en el día del estro) lo cual puede explicar en parte las diferencias en los resultados. La eliminación de las fibras del tipo C que contiene como principal neurotransmisor a la SP resulta en un incremento en las concentraciones de NA ovárica, lo cual puede haber modulado la reactividad de los compartimentos ováricos a las gonadotropinas y por lo tanto mantener sin alteraciones la ciclicidad del animal.

4) en el presente trabajo utilizamos a la cepa de rata CII-ZV, mientras que los autores que realizan la denervación quirúrgica utilizan a la rata Sprague-Dawley, lo cual puede también haber influido sobre los resultados, ya que se sabe que los efectos de los tratamientos de denervación, tanto quirúrgicos como farmacológicos, dependen de la edad del animal, así como de la cepa y la especie que se utilice como modelo experimental.

Los resultados presentados anteriormente indican que la denervación sensorial con capsaicina en el diestro 1 o el diestro 2 provoca una disminución en el porcentaje de animales ovulantes y el tratamiento con el neurotóxico en el diestro 2 (sacrificio en el estro) resultó en un incremento en las concentraciones séricas de estradiol, progesterona y testosterona, lo que indica que durante el diestro la información sensorial participa en la regulación de los mecanismos que regulan las funciones ováricas.

En los animales que no ovularon el incremento en la concentración de progesterona se presentó desde el día del proestro y continuó durante el estro. Este aumento en la concentración de progesterona pudo ser la causa de la

inhibición de la ovulación ya que el incremento en las concentraciones séricas de progesterona fue casi del doble en los animales no ovulantes al compararse con los animales ovulantes. Desde los clásicos estudios de Everett y Sawyer se sabe que la progesterona actúa como un inhibidor de los mecanismos neuroendocrinos que culminan con la ovulación (Everett y Sawyer, 1949).

En los animales denervados con capsaicina en el día del diestro 1 y diestro 2 se observa un incremento en las concentraciones de progesterona, este incremento se inicia en el proestro y continúa durante el estro. Aunado a esto, en las ratas tratadas con capsaicina en el día del diestro 1, diestro 2 o proestro, se observa un incremento en la concentración sérica de estradiol, dicho incremento se presenta durante la etapa de proestro y continua durante el estro. El incremento en la secreción de estradiol y progesterona puede deberse al incremento en las concentraciones de noradrenalina ovárica observado en los animales denervados (Trujillo y col., 2003). Se sabe, que en la rata adulta, la información noradrenérgica estimula la secreción de estradiol (Aguado y Ojeda, 1984); y estudios *in vitro* realizados con células tecales, mostraron que la adición de noradrenalina, adrenalina o isoproterenol al medio de cultivo, incrementan la producción de estrógenos en respuesta a la hCG (Dyer y Erickson, 1985). Es probable también, que el incremento en estradiol, progesterona y testosterona se deba a cambios de la actividad de las enzimas involucradas en la biosíntesis de progesterona (3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa o la P450 scc) y estradiol (P450 aromatasa) (Davoren y Hsueh, 1985; Leung y Steele, 1992).

Hasta el momento no existen evidencias publicadas que muestren la participación de la información sensorial sobre la regulación de la biosíntesis esteroidea en la rata adulta cíclica; estudios de nuestro laboratorio han mostrado que el tratamiento con capsaicina en ratas recién nacidas, sacrificadas el día del primer estro vaginal, no modifica las concentraciones séricas de estradiol y progesterona, sin embargo, cuando el tratamiento con capsaicina se lleva a cabo en el día tres de vida, se observa una disminución significativa en las concentraciones séricas tanto de estradiol como de progesterona (Morán y col., 2003). Los resultados presentados en este trabajo muestran diferencias con lo reportado por Morán y colaboradores (2003). Tales diferencias en la respuesta de los ovarios al tratamiento con capsaicina pueden explicarse como efecto de los diferentes estados de desarrollo del ovario, así como por las diferencias en las concentraciones de NA ovárica en el día del primer estro vaginal y en los ovarios de animales adultos sacrificados en el estro (Chávez y col. 1994; Trujillo y col. 2002).

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten sugerir que la información sensorial participa en la regulación de las funciones del ovario, y que esta participación varía a lo largo del ciclo estral. Nuestros resultados concuerdan con los reportados previamente, en los que se muestra que el diestro 1 y el diestro 2 son los días más sensibles del ciclo estral a los efectos de las drogas bloqueadoras de sistemas de neurotransmisión (colinérgico, dopaminérgico y gabaérgico) (Domínguez y Smith, 1974; Domínguez y col., 1982; 1985).

Existen evidencias que postulan una relación funcional entre la inervación simpática y la sensorial. En la rata, la eliminación de las fibras sensoriales por la

administración de capsaicina, induce hiperinervación simpática en el iris, la cavidad oral y las arterias mesentéricas, mientras que la denervación simpática provoca incremento en la densidad de fibras sensoriales en el tracto urogenital (Schicho y col., 1998; Luthman y col., 1989; Terenghi y col., 1986). En nuestro caso, la administración de capsaicina no resultó en un incremento en las concentraciones de noradrenalina ovárica en todos los días del ciclo estral estudiados; esto puede deberse a la diferencia que existe en la densidad de las terminales nerviosas simpáticas a lo largo del ciclo estral; en la rata adulta la densidad es menor durante el día del estro vaginal, en relación con las otras fases del ciclo estral (Zoubina y col., 1998).

El peso del útero disminuyó en los animales denervados en el día del diestro 2 a pesar del marcado incremento en las concentraciones de estradiol en este mismo grupo de animales; podemos sugerir que la información sensorial del ovario participa modulando la respuesta del útero a los estrógenos; trabajos previos han mostrado que la denervación sensorial quirúrgica (vagotomía bilateral), en la rata prepúber, resulta en retraso en la edad de la apertura vaginal y en una disminución en el peso uterino (Ojeda y col., 1983).

Los resultados obtenidos nos indican que la denervación sensorial con capsaicina modifica la secreción de esteroides durante el proestro y continúa durante el estro, como ya se mencionó, este incremento puede estar relacionado con el incremento en las concentraciones ováricas de NA. Los trabajos clásicos de Bahr y Ben-Jonathan (1981) postulan la relación inversa entre NA y gonadotropinas, por lo que nuestros resultados nos permiten inferir una

disminución en las gonadotropinas, lo que explicaría en parte la disminución en la tasa ovulatoria.

Finalmente, los resultados presentados aquí nos permiten sugerir que la información sensorial es un componente neural que participa en el establecimiento de las condiciones neuroendocrinas que regulan las funciones del ovario y que esta participación varía a lo largo del ciclo estral.

Experimento 2

RESULTADOS

Tratamiento Local

Este experimento se diseñó para analizar los efectos locales de la capsaicina, en la inteligencia de que ese tratamiento sólo destruye las fibras sensoriales que salen del ovario. Para ello el fármaco se administró en la bursa del ovario. Se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

1. Un grupo testigo sin ningún tratamiento.
2. Un grupo tratado con capsaicina (12ng) a las 09:00 horas del día del diestro 1, diestro 2, del proestro o del estro.
3. Un grupo tratado con 50 μ l de vehículo a las 09:00 horas del día del diestro 1, diestro 2, del proestro y estro.

Los animales fueron sacrificados en el día del estro esperado después de tres ciclos estrales consecutivos de la misma duración.

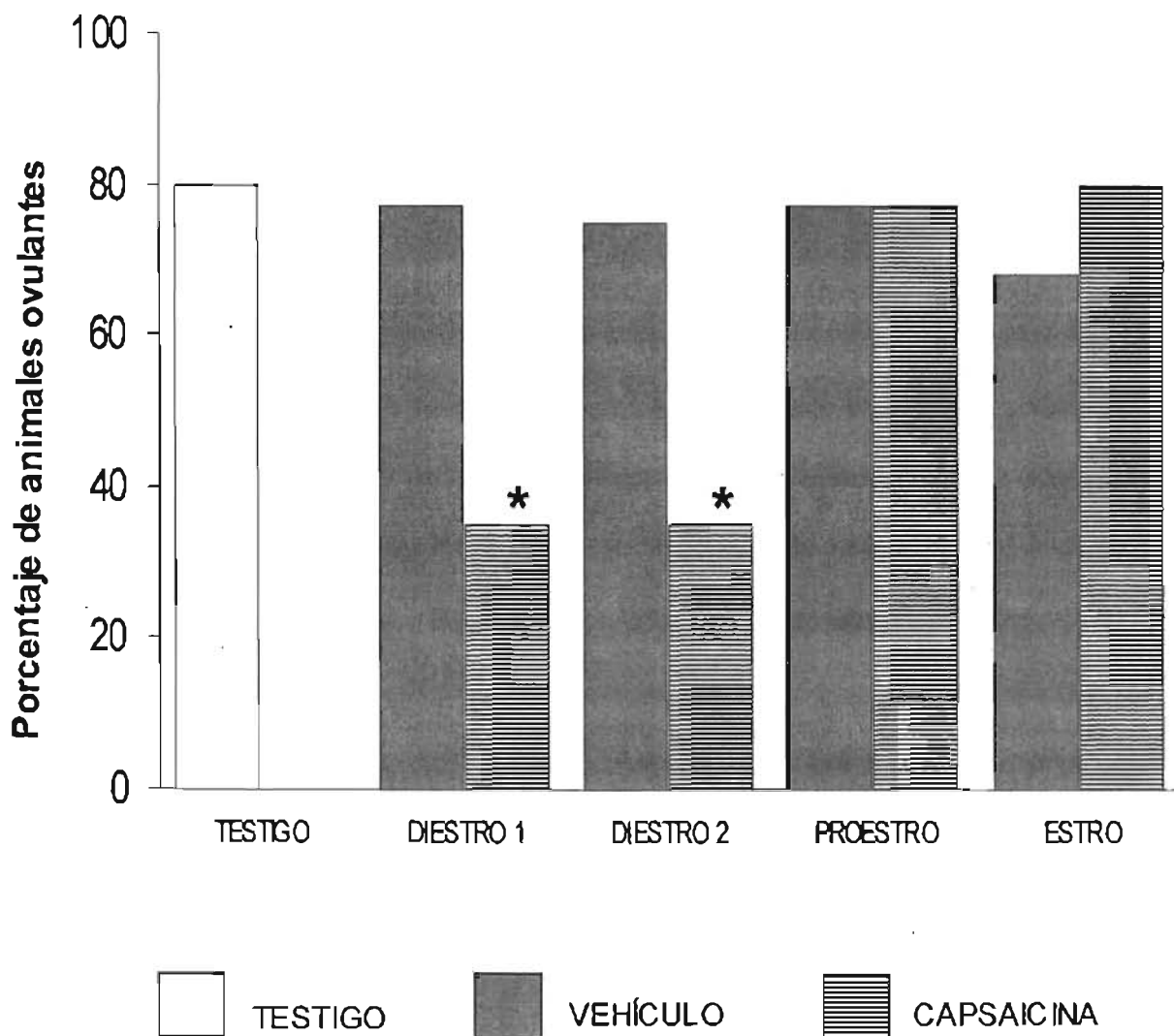
Objetivo 1. Analizar el efecto de la administración intrabursal de capsaicina en el establecimiento del ciclo estral, el porcentaje de animales ovulantes y el número de ovocito liberados, en la rata adulta cíclica.

En comparación con el grupo testigo absoluto no se observaron modificaciones en el ciclo estral de ratas adultas tratadas con capsaicina o vehículo.

El porcentaje de animales ovulantes de los grupos de animales tratados localmente con capsaicina o vehículo en el día del proestro o del estro no se modificó. En cambio, cuando el tratamiento con el neurotóxico se realizó en el día del diestro 1 o del diestro 2, se observó una disminución significativa en el porcentaje de animales ovulantes, al compararse con el grupo tratado con vehículo o con el testigo absoluto (Figura 14).

El número de ovocitos liberados por animal ovulante fue semejante en los tres grupos estudiados (Tabla 9).

Figura 14. Tasa ovulatoria (%) de ratas adultas testigo o tratadas localmente con vehículo o capsaicina en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.



* $p < 0.05$ vs grupo testigo o vehiculo. Ji cuadrada.

Tabla 9. Media \pm e.e.m del número de ovocitos liberados en ratas adultas testigo o tratadas localmente con vehículo (VEH) o capsaicina (CAP) en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.

GRUPO	n	Número de ovocitos liberados		
		OVARIO IZQUIERDO	OVARIO DERECHO	TOTAL
TESTIGO	25	5.2 \pm 0.3	4.9 \pm 0.5	10.2 \pm 0.6
VEH-DIESTRO1	22	5.2 \pm 0.5	5.4 \pm 0.4	10.5 \pm 0.7
CAP-DIESTRO1	20	5.3 \pm 0.4	5.2 \pm 0.3	10.6 \pm 0.6
VEH-DIESTRO2	20	5.2 \pm 0.4	5.3 \pm 0.5	10.5 \pm 0.8
CAP-DIESTRO2	20	5.3 \pm 0.5	5.1 \pm 0.4	10.5 \pm 0.7
VEH-PROESTRO	22	5.3 \pm 0.5	5.2 \pm 0.5	10.6 \pm 0.8
CAP-PROESTRO	22	5.4 \pm 0.3	5.2 \pm 0.4	10.6 \pm 0.6
VEH-ESTRO	22	5.2 \pm 0.6	5.1 \pm 0.5	10.2 \pm 0.8
CAP-ESTRO	25	5.1 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2	10.3 \pm 0.4

Objetivo 2. Analizar los efectos de la administración intrabursal de capsaicina en la secreción de hormonas esteroideas

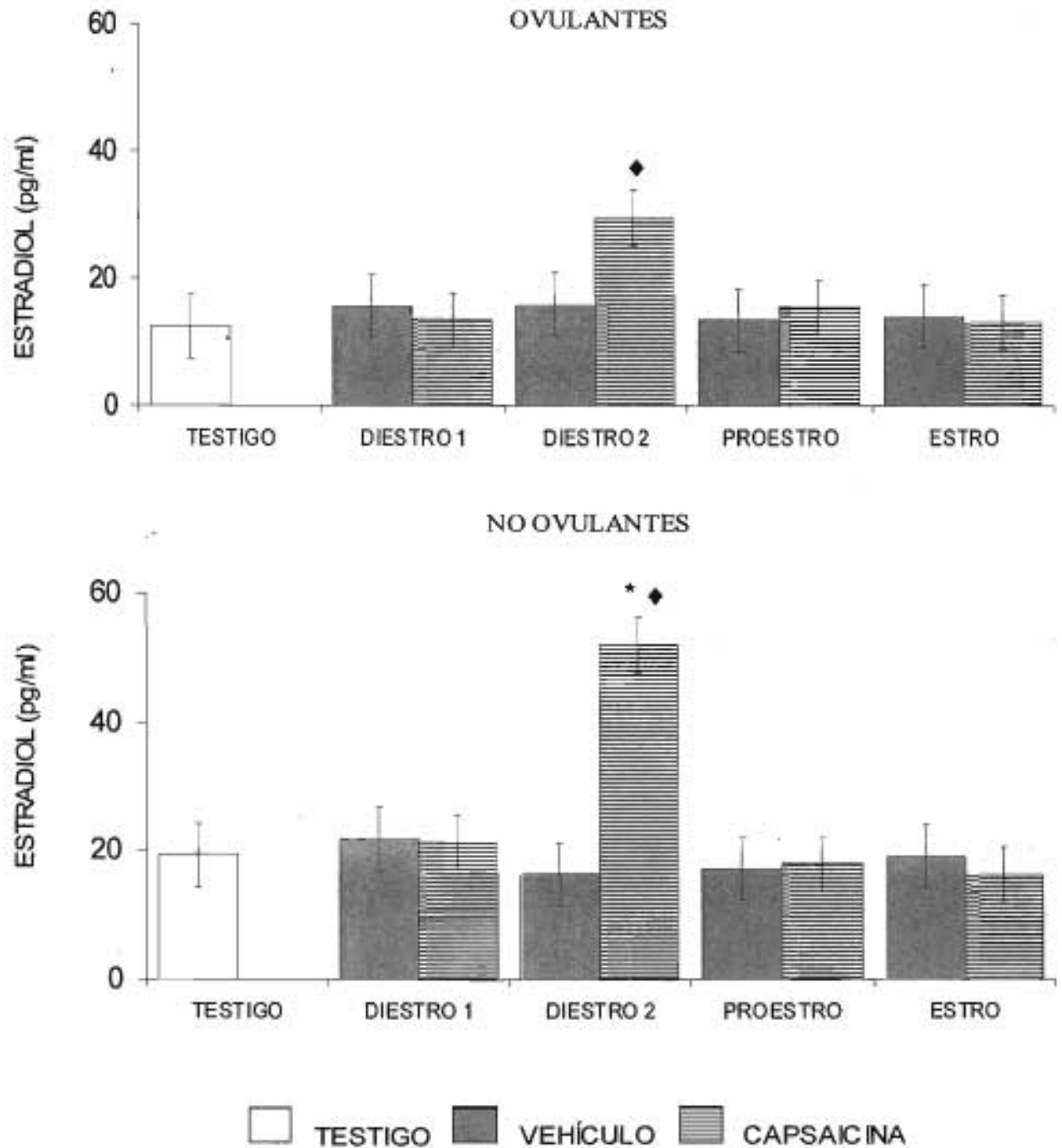
En comparación con el grupo testigo y los animales inyectados con el vehículo, el tratamiento local con capsaicina en el día del diestro 2 resultó en un incremento significativo en las concentraciones séricas de estradiol tanto en animales ovulantes como no ovulantes (Figura 15). El incremento de E_2 en los animales no ovulantes fue mayor que el incremento de la misma hormona en los animales ovulantes (52.1 ± 5.1 vs. 29.5 ± 4.6) (Figura 15).

Las concentraciones séricas de E_2 en los animales tratados con capsaicina o vehículo en el resto de los días del ciclo estral no fueron diferentes al grupo testigo (Figura 15).

La concentración sérica de P_4 en los animales ovulantes y no ovulantes y que fueron tratados con capsaicina en el día del diestro 2 fueron significativamente mayores en comparación con el grupo testigo absoluto o tratado con vehículo el mismo día del ciclo estral,. No se observaron diferencias significativas en los otros grupos tratados con el neurotóxico o el vehículo (Tabla 10).

El tratamiento con capsaicina o vehículo en cada uno de los días del ciclo estral no provocó modificaciones en las concentraciones séricas de testosterona (Tabla 11).

Figura 15. Media \pm e.e.m. de las concentraciones séricas de E₂ en ratas adultas testigo, tratadas con una sola dosis de vehículo (VEH) o capsaicina (CAP) en la bursa del ovario el día del diestro 1, diestro 2, del proestro o del estro; y sacrificadas en el día del estro.



♦ $p < 0.01$ vs grupo testigo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

* $p < 0.01$ vs grupo CAPSAICINA-DIESTRO 2 animales ovulantes. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Tabla 10. Media±e.e.m. de la concentración sérica de P₄ (ng/ml) en ratas adultas testigo, tratadas con una sola dosis de vehículo (VEH) o capsaicina (CAP) en la bursa del ovario el día del diestro 1, diestro 2, del proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.

GRUPO	Animales ovulantes		Animales no ovulantes	
	n	P ₄ (ng/ml)	n	P ₄ (ng/ml)
TESTIGO	20	4.6±0.8	5	5.1±0.9
VEH-DIESTRO 1	17	7.1±1.1	5	6.2±1.5
CAP-DIESTRO 1	7	6.9±1.1	13	8.6±2.1
VEH-DIESTRO 2	15	6.8±0.8	5	6.9±1.1
CAP-DIESTRO 2	7	7.8±0.8*	13	12.1±2.2**♦
VEH-PROESTRO	17	5.2±0.7	5	4.4±1.7
CAP-PROESTRO	17	4.9±1.1	5	5.3±1.1
VEH-ESTRO	15	6.6±1.2	5	4.6±1.2
CAP-ESTRO	20	6.5±1.0	5	5.2±1.2

*p<0.01 vs grupo testigo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

**p<0.01 vs VEH-DIESTRO 2. Prueba "t" de Student.

♦p<0.05 vs.CAP-DIESTRO 2 animales óvulantes. Prueba "t" de Student.

Tabla 11. Media±e.e.m. de las concentraciones séricas de T (pg/ml) en ratas adultas testigo o tratadas con una sola dosis de vehículo (VEH) o capsaicina (CAP) en la bursa del ovario el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro

GRUPO	Animales ovulantes		Animales no ovulantes	
	n	T(pg/ml)	n	T(pg/ml)
TESTIGO	20	100±30	5	98±27.3
VEH-DIESTRO 1	17	109±20	5	100±30
CAP-DIESTRO 1	7	78±19	13	78±23
VEH-DIESTRO 2	15	89±20	5	90±25
CAP-DIESTRO 2	7	108±22	13	100±25
VEH-PROESTRO	17	110±20	5	100±25
CAP-PROESTRO	17	89±25	5	100±30
VEH-ESTRO	15	100±20	5	100±30
CAP-ESTRO	20	79±11	5	97±21

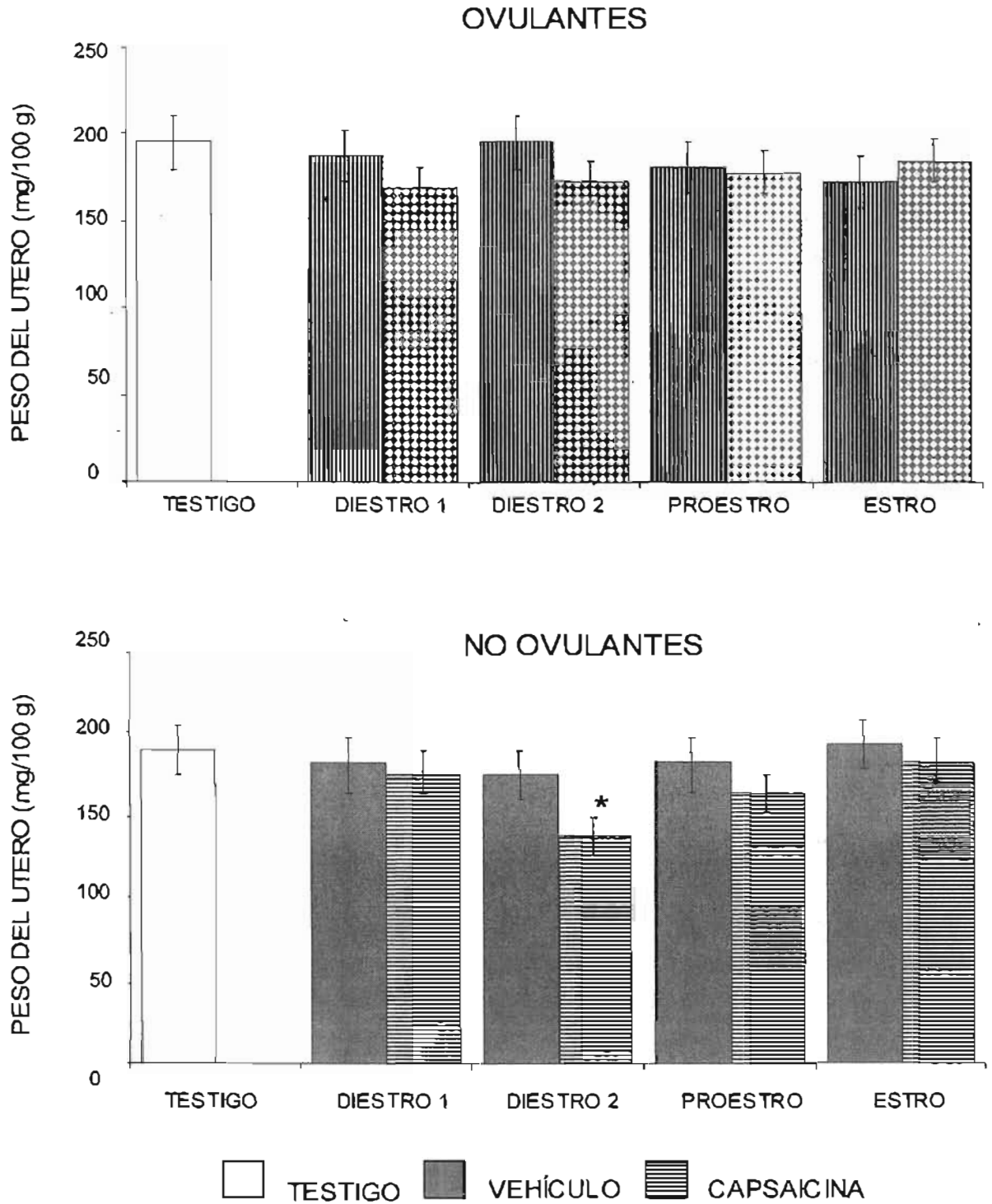
Objetivo 3. Analizar los efectos de la administración intrabursal de capsaicina en el peso corporal, la masa ovárica y el peso del útero de ratas adultas cíclicas.

El tratamiento local con el neurotóxico o con el vehículo no afectó el peso de los ovarios (Tabla 12); el tratamiento con capsaicina en el día del diestro 2 resultó en una disminución significativa del peso del útero de los animales no ovulantes al compararse con el grupo testigo absoluto y el tratado con vehículo el mismo día del ciclo estral (Figura 16).

Tabla 12. Media±e.e.m de la masa ovárica (mg/100 g de peso corporal) de ratas adultas testigo o tratadas localmente con vehículo (VEH) o capsaicina (CAP) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.

GRUPO	Animales ovulantes		Animales no ovulantes	
	n	Masa ovárica	n	Masa ovárica
TESTIGO	20	22.5±1.2	5	22.4±1.1
VEH-DIESTRO 1	17	22.6±1.6	5	22.3±1.2
CAP-DIESTRO 1	7	23.2±1.3	13	22.2±1.1
VEH-DIESTRO 2	15	22.3±6.9	5	22.1±5.9
CAP-DIESTRO 2	7	23.6±1.1	13	22.5±1.2
VEH-PROESTRO	17	23.2±5.8	5	22.8±4.8
CAP-PROESTRO	17	20.9±1.3	5	21.9±1.7
VEH-ESTRO	15	23.4±1.5	5	22.6±1.2
CAP-ESTRO	20	22.8±0.9	5	21.9±0.8

Figura 16. Media \pm e.e.m del peso relativo del útero (mg/100 g de peso corporal) de ratas adultas testigo, tratadas localmente con vehículo (VEH) o capsaicina (CAP) el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.



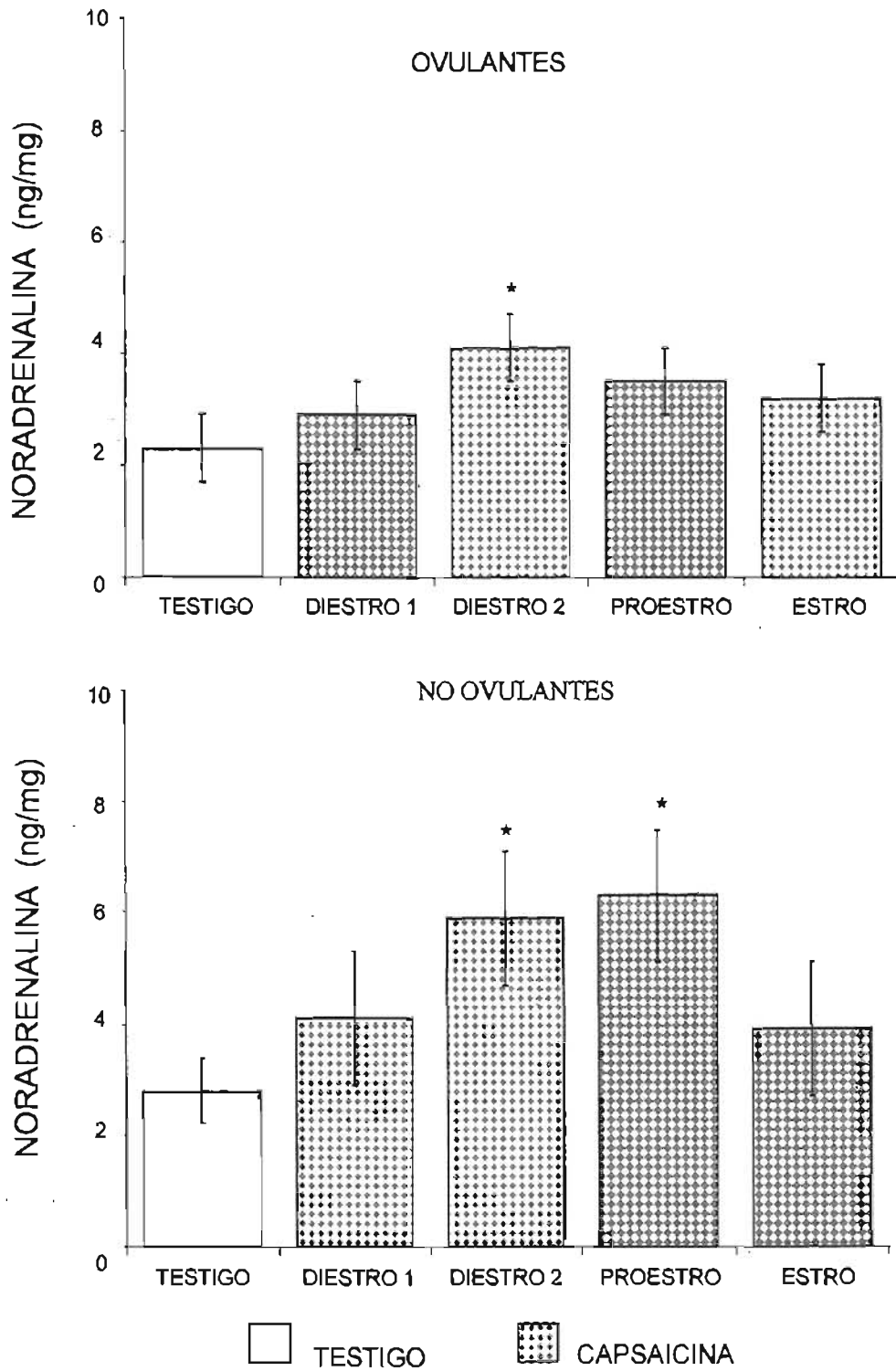
*p<0.05 vs grupo Testigo y su respectivo vehículo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Objetivo 4. Analizar los efectos de la administración intrabursal de capsaicina sobre las concentraciones de noradrenalina ovárica

En las ratas tratadas con una sola dosis de capsaicina y que ovularon, las concentraciones ováricas de noradrenalina no se modificaron en el grupo tratado en el día del estro, del diestro 1 o del proestro. El tratamiento con el neurotóxico resultó en un incremento en las concentraciones de noradrenalina en el grupo inyectado en el día del diestro 2 al compararse con el grupo testigo absoluto (Figura 17).

En los animales no ovulantes, el tratamiento con capsaicina en el día del estro o del diestro 1, no modificó las concentraciones ováricas de noradrenalina en comparación con el grupo testigo absoluto. Sin embargo, el tratamiento con el neurotóxico resultó en un incremento en las concentraciones de noradrenalina en los grupos inyectados en el día del diestro 2 o del proestro (Figura 17).

Figura 17. Media \pm e.e.m de las concentraciones ováricas de noradrenalina (ng/mg) de ratas adultas testigo o tratadas localmente con capsaicina en el día del diestro 1, diestro 2, proestro o estro; y sacrificadas en el día del estro.



* $p < 0.01$ vs grupo testigo. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Discusión

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos permiten sugerir que la información sensorial participa modulando los mecanismos involucrados en la regulación de las funciones del ovario. Se ha propuesto que a través de la inervación sensorial se obtiene información sobre las funciones del ovario vía receptores localizados alrededor de los folículos (Domínguez y col., 1989); dicha información es llevada hacia centros extrahipotalámicos e hipotalámicos, involucrados en la regulación de la secreción de las gonadotropinas, por lo que podría suponerse que la información sensorial forma parte del circuito neuroendócrino que modula las funciones del ovario de la rata adulta (Domínguez y col., 1989; Gerendai y col., 2000; Domínguez y Riboni, 1971; Burden, 1978; Domínguez y col., 1989; Morán y col., 2000).

De tal manera que en este modelo experimental nos propusimos eliminar exclusivamente las fibras sensoriales que salen del ovario, y para ello aplicamos capsaicina en el interior de la bursa del ovario. El tratamiento local con capsaicina resulta en una disminución de la tasa de ovulación, sin cambios en el patrón de ciclicidad del animal, así como un incremento en la secreción de estradiol, progesterona y NA ovárica, que depende del día del ciclo estral cuando se realiza el tratamiento, esto coincide con los resultados obtenidos en el experimento anterior en el que el tratamiento con capsaicina se realizó de manera sistémica, lo que permite sugerir que tanto el modelo de denervación sistémica como el local con capsaicina son herramientas útiles para analizar los efectos de la información

transmitida por las fibras sensoriales que poseen como principal neurotransmisor a la SP sobre las funciones del ovario.

Nuevamente los resultados obtenidos en el presente experimento indican que durante el diestro la inervación sensorial participa de manera predominante en la regulación de los mecanismos que regulan la función ovárica. Estos resultados concuerdan con los reportados previamente por varios autores (Domínguez y Smith, 1974; Domínguez y col., 1982; Domínguez y col, 1985).

En conjunto nuestros resultados nos permiten sugerir que la información sensorial participa en la regulación de la biosíntesis esteroidea y la ovulación, a través de un sistema de comunicación entre el ovario y el SNC, donde el hipotálamo participaría estimulando o inhibiendo dichos mecanismos por medio de la liberación de las gonadotropinas por parte de la hipófisis o bien, por medio de la acción de los neurotransmisores, predominantemente noradrenalina, liberados por las terminales simpáticas localizadas en la gónada; y que la participación de la información sensorial en este modelo de regulación varía a lo largo del ciclo estral.

Experimento 3

Resultados

Tratamiento Sistémico. La rata adulta hemicastrada como modelo de estudio.

Un modelo experimental usado en el estudio de la conexión del ovario con el SNC ha sido la hemicastración. Los efectos de la hemicastración en mamíferos resultan en el establecimiento de la hipertrofia compensadora del ovario *in situ* y en el incremento del número de ovocitos liberados. En la rata hemicastrada, los mecanismos involucrados en el establecimiento de la hipertrofia ovárica compensadora y la ovulación compensadora comprenden cambios en la secreción de gonadotropinas hipofisarias y en la secreción de esteroides ováricos (Greenwald y Roy, 1994). También existen evidencias de un mecanismo neural involucrado en el establecimiento de la hipertrofia ovárica compensadora (Burden y Lawrence, 1977; Chávez y col., 1987).

Con base en los resultados obtenidos en los experimentos anteriores en donde se mostró que los días más sensibles a la denervación sensorial con capsaicina son los días del diestro 1 y 2; se evaluaron los efectos de la denervación sensorial farmacológica en estos días del ciclo estral sobre la regulación del establecimiento de la respuesta compensadora del ovario. Para ello se utilizaron los siguientes grupos experimentales:

1. Grupo testigo (n=12) Sin tratamiento.
2. Grupo tratado con capsaicina. En el día del diestro 1 (n=12) o del diestro 2 (n=12), las ratas fueron inyectadas una sola vez con 50mg/Kg de capsaicina sc, disuelta en vehículo.
3. Grupo testigo inyectado con vehículo. Los animales fueron inyectados en el día del diestro 1 (n=12) o del diestro 2 (n=12) con 0.03 ml del vehículo.

En estos animales se continuó con la toma de frotis vaginales y después de tres ciclos consecutivos de 4 días de duración lo animales fueron hemicastrados estableciéndose los siguientes grupos:

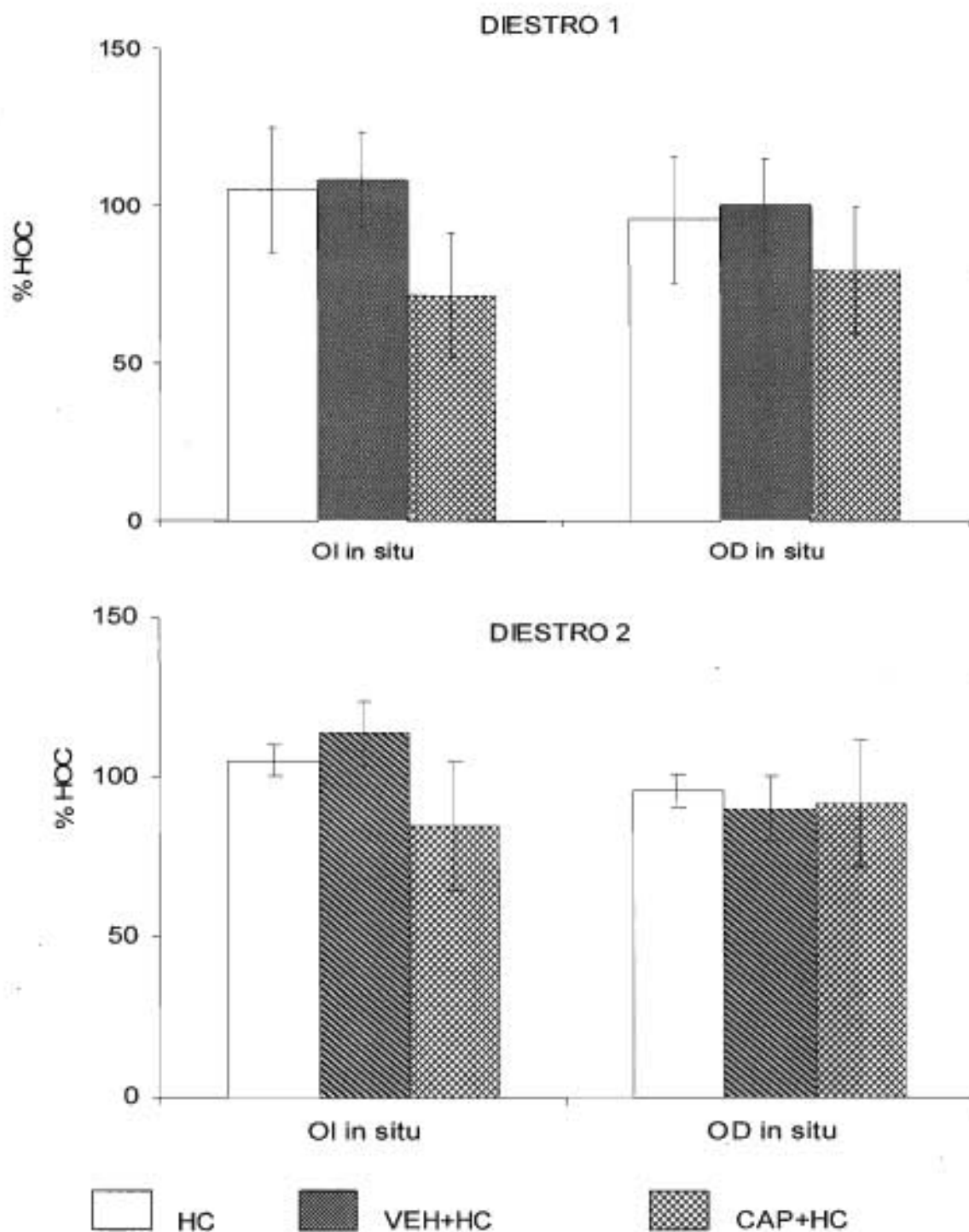
- A) Animales testigo (sin ningún tratamiento farmacológico) fueron hemicastrados del ovario izquierdo (HClzq) o derecho (HCDer) en el día del diestro 1 o diestro 2.
- B) Ratas adultas inyectadas con capsaicina (CAP) y hemicastradas en el día del diestro 1 (D1) o del diestro 2 (D2) del ovario izquierdo o derecho (CAP+HC).
- C) Ratas adultas inyectadas con vehículo (VEH) y hemicastradas del ovario izquierdo o derecho (VEH+HC) en el día del D1 o D2.

Se continuó con la toma de frotis vaginales y después de tres ciclos consecutivos de 4 días de duración los animales fueron sacrificados en el día del estro.

Objetivo 1. Analizar la participación de la información sensorial en el establecimiento de la hipertrofia ovárica compensadora (HOC) .

En comparación con el grupo tratado con vehículo y el grupo de animales sólo hemicastrados, los animales tratados con capsaicina y hemicastrados en el día del D1 o del D2 la denervación farmacológica no modificó el porcentaje de HOC (Figura 18).

Figura 16. Media±e.e.m. del porcentaje de hipertrofia ovárica compensadora de ratas adultas hemicastradas (HC), tratadas con vehículo (VEH+HC) o capsaicina (CAP+HC) el día del diestro 1 ó diestro 2 y sacrificadas en el día del estro.

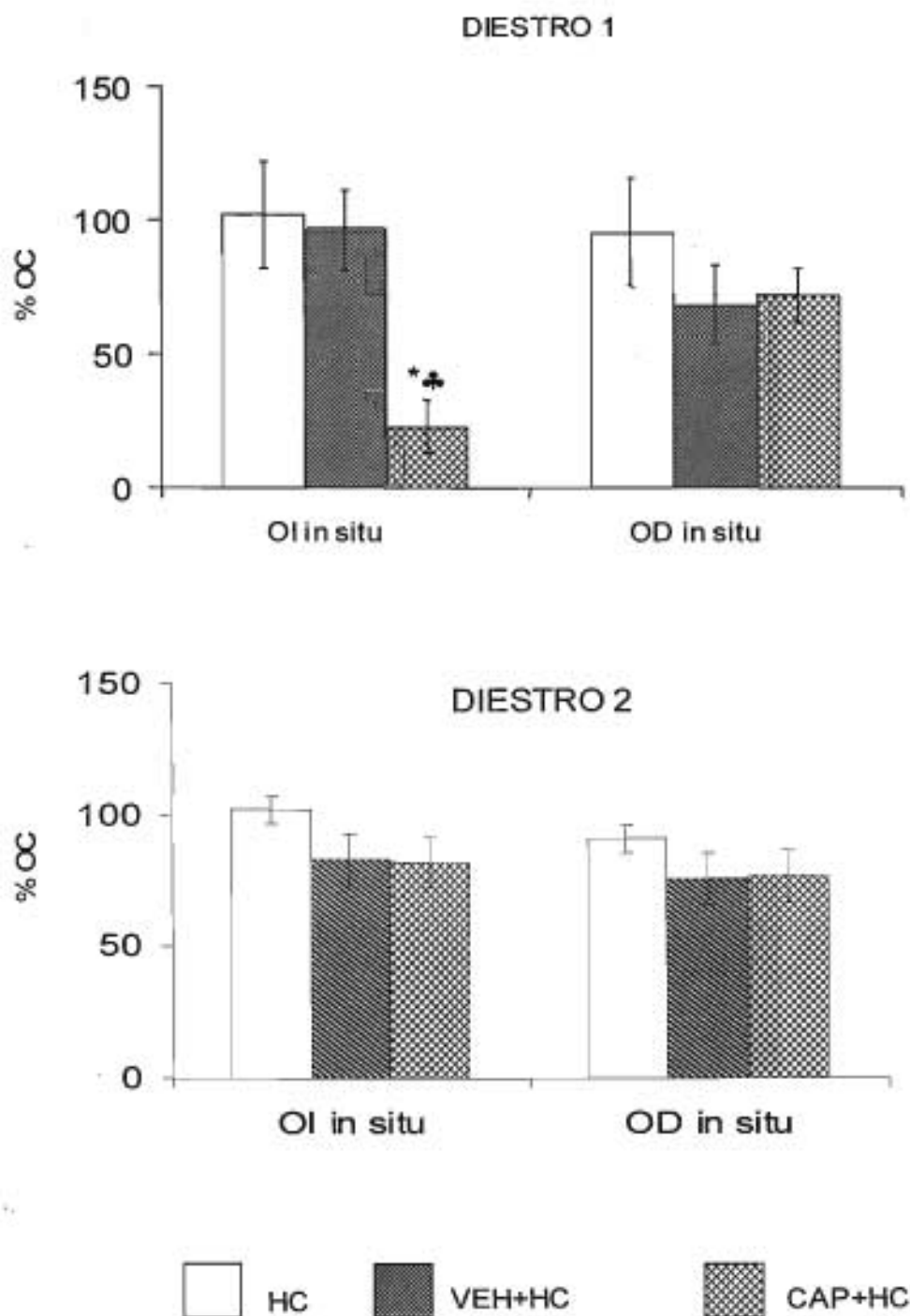


Objetivo 2. Analizar la participación de la información sensorial sobre la ovulación compensadora (OC) .

En comparación con el grupo de animales sólo hemicastrados, los animales tratados con capsaicina el día del diestro 1 y hemicastrados del ovario derecho presentaron una disminución del porcentaje de ovulación compensadora del ovario *in situ*. Cuando el ovario *in situ* fue el derecho no se observaron modificaciones en la OC en comparación con el grupo de animales sólo hemicastrados (Figura 19).

En el grupo tratado con capsaicina en el diestro 2 seguido de la hemicastración no se observan cambios significativos en el porcentaje de ovulación compensadora al compararse con el grupo tratado con vehículo y el hemicastrado (Figura 19).

Figura 19. Media±e.e.m. del porcentaje de ovulación compensadora (OC) en animales testigo, tratados con vehículo (VEH+HC) ó capsaicina (CAP+HC) en el día del diestro 1 ó 2 y autopsiados en el día del estro.



*p<0.05 vs. Grupo HC y VEH+HC. Prueba "U" de Mann-Whitney.

*p<0.05 vs. Grupo CAP+HC ovario derecho in situ. Prueba "U" de Mann-Whitney.

La administración de capsaicina en el día del diestro 1 seguida de la hemicastración del ovario derecho (ovario izquierdo *in situ*) resultó en una disminución del número de ovocitos liberados al compararse con el grupo tratado con vehículo y con el ovario izquierdo *in situ* y con el grupo sin tratamiento y hemicastrado del ovario derecho.

El número de ovocitos liberados no se modificó en los animales tratados con capsaicina o vehículo en el diestro 1 seguida de la hemicastración del ovario izquierdo.

Cuando el tratamiento se realizó en el día del diestro 2, no se observaron cambios significativos en el número de ovocitos liberados (Tabla 13).

Tabla 13. Media \pm e.e.m. del número de ovocitos liberados en animales testigo, tratados con vehículo o capsaicina en el día del diestro 1 ó 2 y hemicastrados.

Tratamiento	Diestro 1		Diestro 2	
	Número de ovocitos liberados		Número de ovocitos liberados	
GRUPO	Ovario <i>in situ</i>		Ovario <i>in situ</i>	
	IZQUIERDO	DERECHO	IZQUIERDO	DERECHO
HC	10.3 \pm 0.5	10 \pm 0.6	10 \pm 0.6	10 \pm 0.6
VEH + HC	9.8 \pm 0.5	8.7 \pm 0.5	9 \pm 0.3	9 \pm 0.3
CAP + HC	6.5 \pm 0.3*	8.8 \pm 0.3	9.2 \pm 0.3	9.2 \pm 0.3

*p<0.05 vs. Grupo HC y VEH+HC. Kruskal-Wallis seguida de la prueba U de Mann-Whitney.

Objetivo 3. Analizar la participación de la información sensorial en la secreción de hormonas esteroideas en la rata adulta hemicastrada.

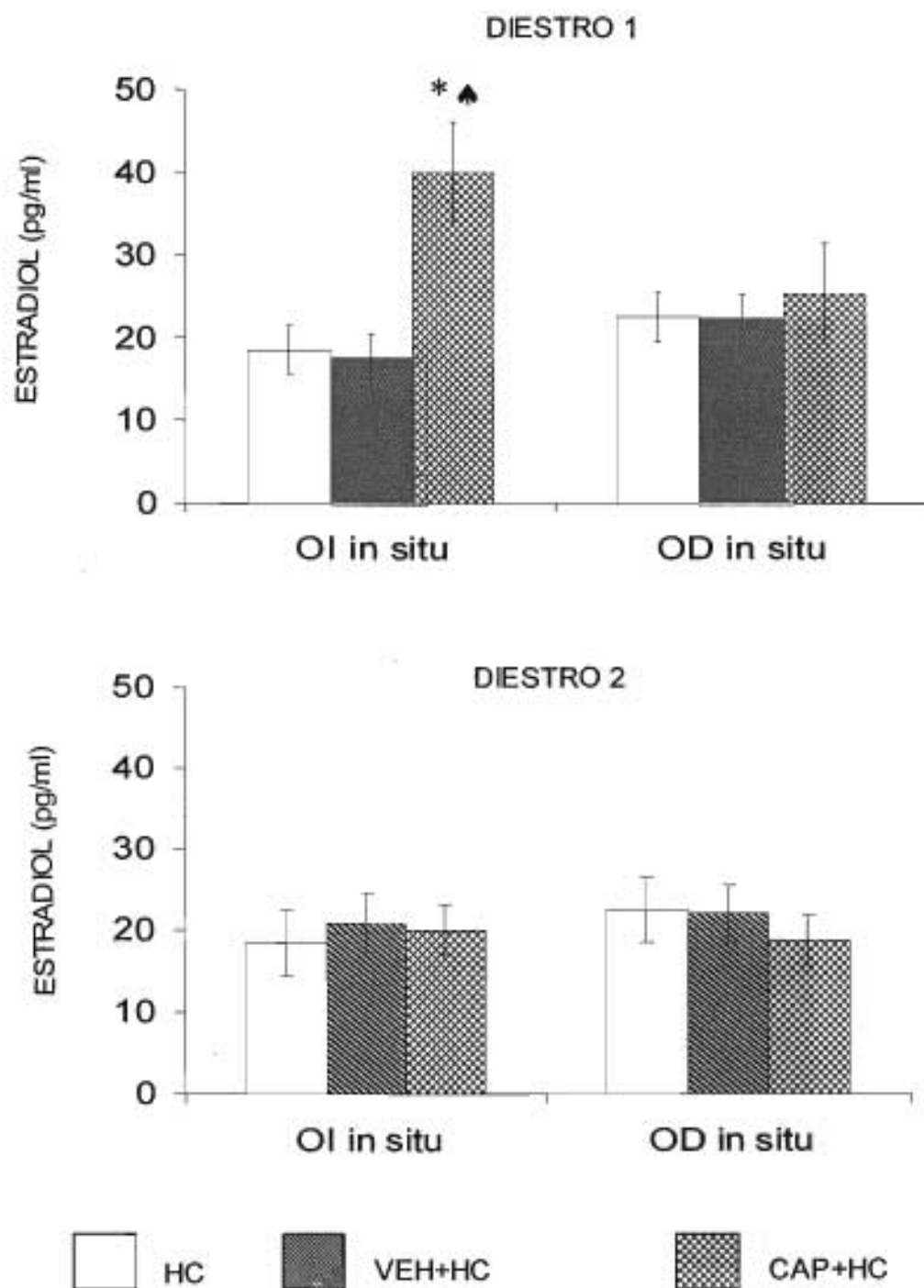
En el grupo de animales tratados con capsaicina en el día del diestro 1 con el ovario izquierdo *in situ* se observó un incremento en las concentraciones séricas de E₂, al compararse con el grupo tratado con vehículo y con el grupo de animales hemicastrados (Figura 20).

No se presentaron cambios significativos en la secreción de E₂ en el grupo de animales tratados con capsaicina en el diestro 1, seguida de la hemicastración del ovario izquierdo (ovario derecho *in situ*).

En el grupo de animales tratados con capsaicina en el día del diestro 2 y hemicastrados, no se observaron cambios en la secreción de E₂ al compararse con el grupo tratado con vehículo o el hemicastrado (Figura 20).

La concentración de progesterona no se modificó con ningún tratamiento (Figura 21).

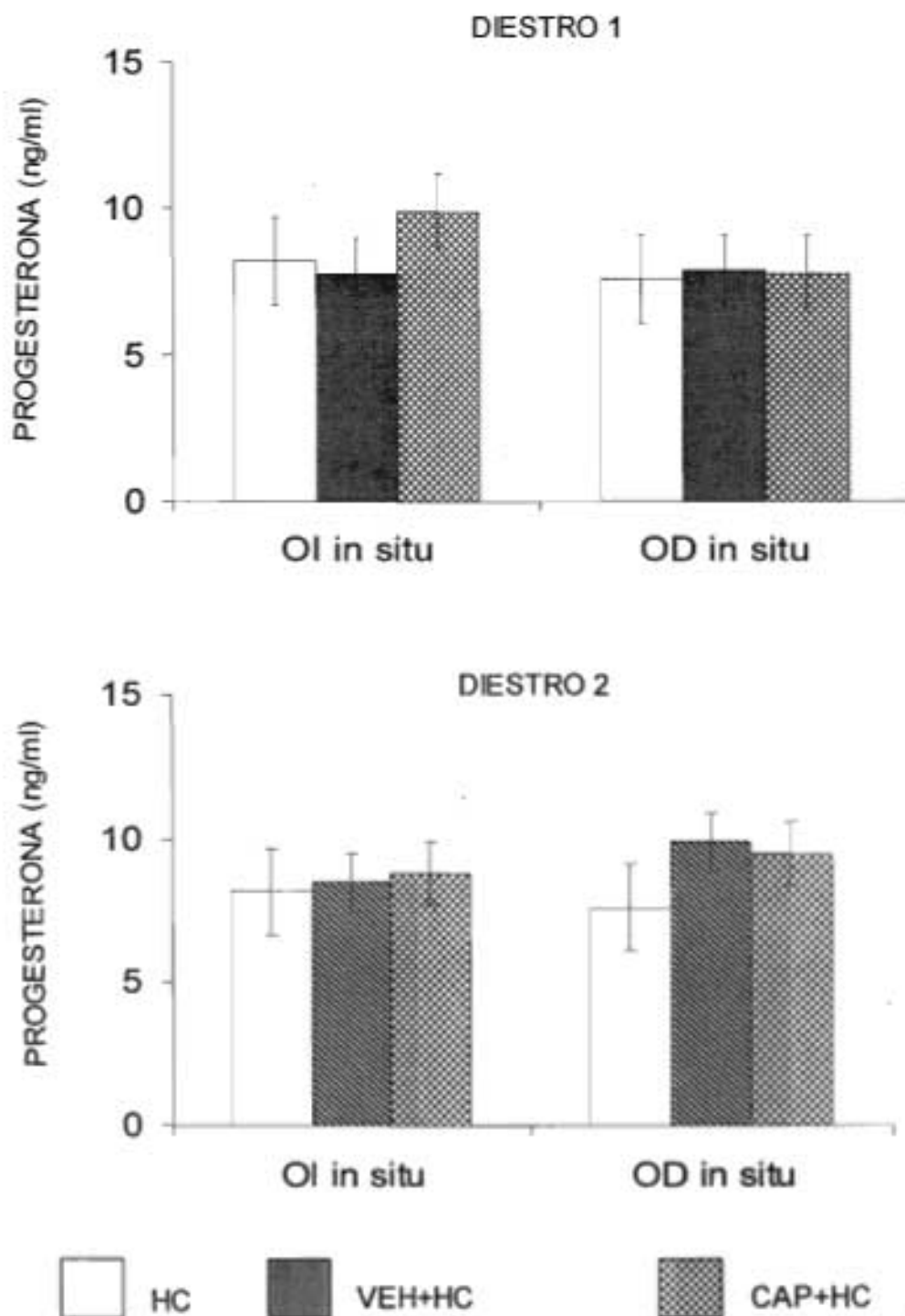
Figura 20. Media±e.e.m. de las concentraciones plasmáticas de estradiol (pg/ml) en ratas adultas testigo y tratadas con vehículo (VEH+HC) o capsaicina (CAP+HC) el día del diestro 1 o diestro 2 y sacrificadas en el día del estro.



*p<0.01 vs. Grupo HC y VEH+HC OI in situ. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

▲p<0.001 vs. Grupo HC y VEH+HC OD in situ. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey

Figura 21. Media \pm e.e.m. de las concentraciones plasmáticas de progesterona (ng/ml) en ratas adultas testigo y tratadas con vehículo (VEH+HC) o capsaicina (CAP+HC) el día del diestro 1 o diestro 2 y sacrificadas en el día del estro.



Objetivo 4. Analizar la participación de la inervación sensorial en el peso de los ovarios y del útero de ratas adultas cíclicas hemicastradas.

El tratamiento sistémico con el neurotóxico en el día del diestro 1 seguido de la hemicastración del ovario derecho (ovario izquierdo *in situ*), resultó en una disminución en el peso del ovario *in situ* al compararse con el grupo tratado con vehículo (Tabla 14). En los animales tratados con capsaicina o vehículo el mismo día del ciclo estral y hemicastrados del ovario izquierdo (ovario derecho *in situ*), el peso del ovario *in situ* no se modificó al compararse con el grupo sólo hemicastrado.

El tratamiento con capsaicina o con el vehículo en el día del diestro 2 no afectó el peso de los ovarios de los animales hemicastrados (Tabla 14).

En lo que se refiere al peso del útero el tratamiento con capsaicina en el día del diestro 1 seguido de la hemicastración del ovario derecho (ovario izquierdo *in situ*), resultó en una disminución en dicho parámetro al compararse con el grupo tratado con vehículo y con el grupo hemicastrado.

El tratamiento sistémico con capsaicina en el día del diestro 2 seguido de la hemicastración no provocó cambios en el peso del útero (Tabla 15).

Tabla 14. Media±e.e.m. del peso de los ovarios en ratas adultas testigo, tratadas con vehículo (VEH) o capsaicina (CAP) el día del diestro 1 o diestro 2 y sacrificadas en el día del estro.

Tratamiento	Diestro 1		Diestro 2	
	Peso de los ovarios (mg/100g de peso corporal)		Peso de los ovarios (mg/100 g de peso corporal)	
	<i>Ovario in situ</i>		<i>Ovario in situ</i>	
GRUPO	IZQUIERDO	DERECHO	IZQUIERDO	DERECHO
HC	17.4±0.2	18.4±1.7	17.4±1.2	18.4±1.7
VEH + HC	17.7±1.6	18.8±1.6	14.5±2.7	17.9±0.5
CAP + HC	14.6±1.1*	16.8±0.9	15.7±1.1	18.±2.1

*p<0.05 vs. Grupo HC y VEH+ HC ovario izquierdo in situ. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Tabla 15. Media±e.e.m. del peso del útero en ratas adultas testigo, tratadas con vehículo (VEH) o capsaicina (CAP) el día del diestro 1 o diestro 2 y sacrificadas en el día del estro.

Tratamiento	Diestro 1		Diestro 2	
	Peso del útero (mg/100g de peso corporal)		Peso del útero (mg/100 g de peso corporal)	
	<i>Ovario in situ</i>		<i>Ovario in situ</i>	
GRUPO	IZQUIERDO	DERECHO	IZQUIERDO	DERECHO
HC	175±24.6	170.6±24.2	175±24.6	170.6±24.2
VEH + HC	205.4±19.6	166.5±14.7	143.1±29.2	164.1±16.5
CAP + HC	117.4±15.6*	185.7±19.5	170±36.4	184.6±18.7

*p<0.05 vs. Grupo HC y VEH+ HC ovario izquierdo in situ. ANDEVA seguida de la prueba de Tukey.

Discusión

Se ha mostrado en trabajos previos, que en la rata adulta, la participación de la información ovárica noradrenérgica en el establecimiento de la hipertrofia ovárica compensadora depende del día del ciclo estral en el que se realiza la hemicastración y la denervación (Chávez y Domínguez, 1994); lo que sugiere que hay cambios significativos en los mecanismos neurales que modulan los efectos de la inervación ovárica sobre la función de la gónada. Los resultados presentados en este trabajo apoyan la idea de que la participación de la inervación en la respuesta compensadora del ovario depende del día del ciclo estral cuando se realiza la denervación y la hemicastración. De tal manera podemos sugerir que la información sensorial que sale del ovario participa en el establecimiento de los mecanismos que regulan las funciones del ovario y que dicha participación depende del ambiente neuroendocrino del animal.

El tratamiento con capsaicina resulta en cambios en el establecimiento de la ovulación compensadora, y estas diferencias dependen del día del ciclo estral cuando se lleva a cabo la denervación sensorial así como del ovario extirpado. Trabajos previos han descrito diferencias en el establecimiento de la ovulación compensadora en distintas especies como la mujer (Potashnik y col., 1987), la cerda (Hunter y col., 1985) y la mona (Morse y Van Wagenen, 1936). En la rata, estas diferencias están relacionadas con el número de ovocitos liberados por el ovario derecho y el ovario izquierdo, y tales diferencias están relacionadas con la inervación ovarica (Chávez y Domínguez, 1994; Morales y col., 1998), así como

también con la edad del animal en la que se lleva a cabo la hemicastración (Morales y col., 1993).

Chávez y colaboradores (1987) mostraron que la ovulación compensadora en ratas adultas hemicastradas del ovario izquierdo o derecho con sección unilateral o bilateral del nervio vago y sacrificadas el día del estro fue normal al compararse con el grupo control. Sin embargo; estos animales mostraron una disminución en el establecimiento de la hipertrofia compensadora del ovario. Nuestros resultados indican que el tratamiento con capsaicina en el diestro no afecta el establecimiento de la hipertrofia compensadora del ovario independientemente del ovario extirpado. Sin embargo, observamos que el tratamiento con capsaicina resulta en una disminución significativa en el establecimiento de la ovulación compensadora del ovario. Las diferencias observadas entre los trabajos de Chávez y colaboradores y los nuestros puede deberse al tipo de tratamiento que se utilizó, denervación quirúrgica versus denervación farmacológica, así como al día en el que se llevó a cabo la hemicastración y la denervación. Con la vagotomía se afecta a todos los tipos de fibras que transcurren por el nervio, en cambio la denervación con capsaicina afecta principalmente a las fibras aferentes no mielinizadas, y en menor grado a las mielinizadas del tipo A.

Por otro lado, Morán y colaboradores (2003) mostraron que la hemicastración en animales tratados con capsaicina al nacimiento resulta en un incremento en el porcentaje de la ovulación compensadora por el ovario derecho; y al contrario, la ovulación compensadora disminuye cuando el ovario in situ es el

izquierdo, aunado a ésto, no se observaron diferencias en la hipertrofia compensadora del ovario.

Nuestros resultados junto con los ya reportados previamente, nos permiten sugerir que existe información diferente que sale del ovario derecho y del izquierdo hacia el sistema nervioso central. Es posible que, en el animal hemicastrado los sistemas neuroendocrinos que controlan el crecimiento y la ovulación compensadora del ovario estén organizados de manera diferente dependiendo de sí la información neural proviene del ovario izquierdo o del derecho, y de su llegada al lado izquierdo o derecho del hipotálamo.

Morán y colaboradores (2003) mostraron que en la rata, el tratamiento con capsaicina y la hemicastración a los 20 días de edad, resultó en una disminución significativa en la concentración sérica de progesterona en el grupo de animales con el ovario derecho *in situ*. Por otro lado, este mismo grupo de animales presentó un incremento en las concentraciones plasmáticas de estradiol. Nuestros resultados muestran un incremento en las concentraciones plasmáticas de estradiol cuando los animales son tratados con capsaicina en el día del diestro 1 y hemicastrados del ovario derecho (ovario izquierdo *in situ*). Una posible explicación sobre los cambios en las concentraciones plasmáticas de estradiol por parte del animal hemicastrado y denervado con capsaicina es el hecho de que el neurotóxico altera los nervios sensoriales que contienen a la SP, VIP y al CGRP como neurotransmisores (Dees y col., 1986; Ojeda y col., 1985; Papka y col., 1985; Calka y col., 1988; Klein y Burden, 1988a; McNeill y Burden, 1987). Estos

péptidos juegan un papel importante en la comunicación entre neuronas sensoriales primarias y otras células neurales y no-neurales, y existen evidencias de que estos péptidos estimulan la secreción de esteroides *in vitro* ((Davoren y Hsueh, 1985; Leung y Steele, 1992; Pitzel y col., 1991; George y Ojeda, 1987).

No podemos descartar el hecho de que el incremento en las concentraciones plasmáticas de estradiol puede deberse a un incremento en el contenido de noradrenalina ovárica. En este experimento no medimos las concentraciones ováricas de noradrenalina, pero en resultados previos hemos mostrado que en la rata adulta la administración intrabursal de capsaicina en el día del D1 resulta en un incremento en las concentraciones de NA ovárica (Trujillo y col., 2003). Se sabe, que en la rata adulta, la descarga noradrenérgica estimula la secreción de estradiol (Aguado y Ojeda, 1984). Es probable también, que el incremento en estradiol se deba a cambios de la actividad de la enzima P450 aromatasas involucrada en la biosíntesis de estradiol.

Basados en nuestros resultados, y los disponibles en la literatura, proponemos que el tratamiento con capsaicina afecta la respuesta compensadora del ovario y la secreción de estradiol vía el sistema sensorial-simpático. Se ha propuesto que la vía sensorial obtiene información sobre las funciones del ovario a través de receptores localizados alrededor de los folículos (Dornínguez y col., 1989). Dicha información es llevada hacia centros extrahipotalámicos e hipotalámicos, el hipotálamo participaría estimulando o inhibiendo dichos mecanismos por medio de la liberación de las gonadotropinas por parte de la hipófisis o bien, por medio de la acción de los neurotransmisores,

predominantemente noradrenalina, liberados por las terminales simpáticas localizadas en la gónada; por lo que podría suponerse que la información sensorial forme parte del circuito neuroendocrino que modula las funciones del ovario de la rata adulta (Domínguez y col., 1989; Gerendai y col., 2000; Domínguez y Riboni, 1971; Burden, 1978; Morán y col., 2000). De tal manera que en la rata adulta hemicastrada, tanto la información aferente como eferente del ovario participaría en la respuesta compensadora del ovario y en la secreción de hormonas. Además, los resultados obtenidos en el presente trabajo apoyan el concepto de la respuesta asimétrica de los ovarios a la denervación y que la participación de la información sensorial varía a lo largo del ciclo estral.

MODELO PROPUESTO PARA EXPLICAR LA PARTICIPACIÓN DE LA INERVACIÓN EXTRÍNSECA DEL OVARIO SOBRE LAS FUNCIONES DE LA GÓNADA (Figura 22).

SEÑAL AFERENTE.

Se muestran las vías por las que la inervación sensorial llega al mesencéfalo. El soma de las fibras sensoriales que provienen del ovario se encuentra localizado en el ganglio de la raíz dorsal y de ahí envía sus proyecciones hacia el núcleo del tracto solitario, que es un regulador de las aferencias y eferencias autónomas de los órganos viscerales. Este centro podría actuar como un regulador enviando respuestas hacia el órgano de donde proviene la señal sensorial y por otra parte serviría también como un integrador de la señal autónoma por medio de la participación de centros hipotalámicos y extrahipotalámicos.

SEÑAL EFERENTE.

Las señales eferentes serían llevadas por las fibras simpáticas y parasimpáticas del sistema nervioso autónomo. Las eferencias salen del núcleo paraventricular y lateral del hipotálamo, el núcleo parabraquial, el núcleo del tracto solitario y de ciertos grupos neuronales localizados en las regiones A5-A7 del tallo cerebral.

Basados en estos resultados y los disponibles en la literatura, es posible proponer que el tratamiento con capsaicina afecta la respuesta del ovario y la secreción de hormonas gonadales vía un sistema sensorial-simpático. De tal manera que en la rata adulta, tanto la información aferente como eferente del ovario participaría en la respuesta del ovario y en la secreción de hormonas. Además, los resultados apoyan el concepto de la respuesta asimétrica de los ovarios a la denervación y que la participación de la información sensorial varía a lo largo del ciclo estral.

CONCLUSIONES

Existe una relación funcional entre la inervación sensorial del tracto reproductivo de la rata adulta y el contenido de noradrenalina ovárica.

La información sensorial participa en la regulación de las funciones del ovario y dicha participación varía a lo largo del ciclo estral, vía un posible sistema sensorial-simpático.

La información sensorial proveniente del ovario participa de manera inhibitoria en la secreción de estradiol, progesterona y testosterona durante el diestro.

La información sensorial del ovario durante el diestro, tiene un papel estimulante en los mecanismos que regulan la ovulación.

Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan el concepto de la respuesta asimétrica de los ovarios a la denervación

En la rata adulta hemicastrada la información sensorial participa regulando la respuesta compensadora del ovario.

PERSPECTIVAS

Analizar si el incremento en la secreción de estradiol y progesterona está relacionada con cambios en la expresión del número de receptores β -adrenérgicos a nivel del ovario.

Analizar si el incremento en la secreción de estradiol y progesterona está relacionada con cambios en la expresión y actividad de los sistemas enzimáticos involucrados en la biosíntesis de estas hormonas (3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa o la P450 scc y P450 aromatasa).

Analizar los cambios en la secreción de gonadotropinas ante el tratamiento con capsaicina a lo largo del ciclo estral.

Analizar si el tratamiento con capsaicina altera la aparición de receptores a gonadotropinas.

Analizar si la información sensorial modula la acción de factores neurotróficos como el Factor de Crecimiento Neural (NGF).

BIBLIOGRAFÍA

- Aaltonen J, Laitinen MP, Vuololainen K, Jaatinen R, Horelli-Kuitunen N, Seppa L, Louhio H, Tuuri T, Sjoberg J, Butzow R, Hovata O, Dale L, Ritvos O (1999)** Human growth differentiation factor-9 (GDF-9) and its novel homolog GDF-9B are expressed in oocytes during early folliculogenesis. *Journal of Clinic and Endocrinology Metabolism* **84**: 2744-2750
- Aguado LI, Ojeda SR (1984)** Ovarian adrenergic nerves play on role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology* **114**: 1944-1946
- Ahmed CE, Dees WL, Ojeda SR (1986)** The immature rat ovary is innervated by vasoactivo intestinal peptide (VIP)-containing fibers and responds to VIP with steroid secretion. *Endocrinology* **118**: 1682-1689
- Amsterdam A, Dantes A, Hosokawa K, Schere-Levy CP, Kotsuji F, Aarón D (1998)** Steroid regulation during apoptosis of ovarian follicular cells. *Steroids* **63**: 314-318
- Bahr J, Ben-Jonathan N (1981)** Preovulatory depletion of ovarian catecholamines in the rat. *Endocrinology* **108**: 1815-1820
- Bendell JJ, Dorrington J (1988)** Rat thecal/interstitial cells secrete a transforming growth factor-beta-like factor that promotes growth and differentiation in rat granulosa cells. *Endocrinology* **123**:941-948
- Bonifacino JS, Dufau M (1984)** Prolactin receptors in the ovary. En: **Hormone Receptors in Growth and Reproduction**. B.B. Saxena (Ed.) Raven Press. New York, pp. 149-163

- Brown RE** (1994) **An Introduction to Neuroendocrinology**. Cambridge University Press. New York, pp. 125-139.
- Burden HW, Lawrence IE Jr** (1977) The effects of denervation on compensatory hypertrophy. *Neuroendocrinology* **23**: 360-378
- Burden HW** (1978) Ovarian innervation. En: **The Vertebrate Ovary: Comparative Biology**. R.E. Jones (Ed). Plenum Press. New York. pp. 616-638
- Burden HW, Lawrence IE Jr** (1978) Experimental studies on the acetylcholinesterase-positive nerves in the ovary of the rat. *The Anatomical Record* **190**:233-241
- Burden HW, Lawrence IE Jr, Louis TM, Hodson CA** (1981) Effect of abdominal vagotomy on the estrous cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy. *Neuroendocrinology* **33**: 218-22
- Burden HW, Lawrence IE Jr, Louis MT, Hodson CA** (1983) Abdominal vagotomy does not activate the hábeas luteum in rats. *Neuroendocrinology* **37**: 288-290
- Burden HW** (1985) The adrenergic innervation of mammalian ovaries. En: **Catecholamines as Hormone Regulators**. N. Ben-Jonathan, J.M. Bahr, R.I. Weiner (Eds). Raven Press. New York, pp. 261-278
- Burks TF, Buck SH, Miller MS** (1985) Mechanisms of depletion of substance P by capsaicin. *Federation Proceedings* **44**: 2531-2534
- Calka J, McDonald JK, Ojeda SR** (1988) The innervation of the immature rat ovary by calcitonin gene-related peptide. *Biology of Reproduction* **39**: 1215-1223
- Carlson RR, De Feo VJ** (1965) Role of the pelvic nerve vs. the abdominal sympathetic nerves in the reproductive function of the female rat. *Endocrinology* **77**: 1014-1022

- Carrillo P, Manzo J, Martínez-Gómez M, Salas M, Pacheco P** (1994) Neonatal capsaicin administration: Effects on behavioral development of the rat. *Pharmacology Biochemistry and Behavior* **48**: 447-452
- Chávez R, Cruz ME, Domínguez R** (1987) Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats effects of ipsi-and contralateral vagus nerves on the remaining ovary. *Journal Endocrinology* **113**: 397-401
- Chávez R, Domínguez R** (1994) Participation of the superior ovarian nerve in the regulation of compensatory ovarian hypertrophy: the effects of its section performed on each day of the oestrous cycle. *The Journal of Endocrinology* **140**:197-201
- Collins JJ, Lin CE, Berthoud HR, Papka RE** (1999) Vagal afferents from the uterus and cervix provide direct connections to the brainstem. *Cell and Tissue Research* **295**: 43-54
- Conn M** (1994) The molecular mechanism of gonadotropins-releasing hormone action in the pituitary. En: **The Physiology of Reproduction**. E. knobil, J. Neill (Eds). Raven Press. New York, pp. 1815-1832
- Cruz ME, Chávez R, Domínguez R** (1986) Ovulation, follicular growth and ovarian reactivity to exogenous gonadotropins in adult rats with unilateral or bilateral section of the vagi nerves. *Revista de Investigación Clínica* **38**:167-171
- D'Albora H, Barcia JJ** (1996) Intrinsic neuronal cell bodies in the rat ovary. *Neuroscience Letters* **205**: 65-70
- D'Albora H, Lombide P, Ojeda SR** (2000) Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. *Cell and Tissue Research* **300**: 47-56
- Davoren JB, Hsueh AJ** (1985) Vasoactive intestinal peptide: a novel stimulator of steroidogenesis by cultured rat granulosa cells. *Biology of Reproduction* **33**: 37-52

Dees WL, Ahmed CE, Ojeda SR (1986) Substance P- and vasoactive intestinal peptide-containing fibers reach the ovary by independent routes. *Endocrinology* **119**: 638-641

Dees WL, Hiney JK, Schulte TD, Mayerhofer A, Danilchik M, Dissen GA, Ojeda SR (1995) The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. *Endocrinology* **136**: 5760-5768

Dekel N, Snerizin Y, Tsafiri A, Naor Z (1983) A comparative study of the mechanism of action of luteinizing hormone and gonadotropin releasing hormone analog on the ovary. *Biology of Reproduction* **28**: 161-166

Dissen G, Dees WL, Ojeda SR (1993) Neural and neurotrophic control of ovarian development. En: The Ovary. E. Y. Adashi, P.C.K. Leung (Eds). Raven Press. New York, pp. 1-119

Dissen G, Ojeda SR (1999) Ovarian innervation. En: Encyclopedia of Reproduction. E. Knobil, J. Neill (Eds). Academic Press. San Diego California, pp. 583-589

Domínguez R, Riboni L (1971) Failure in ovulation in hemispayed autografted ovary. *Neuroendocrinology* **7**: 164-170

Domínguez R, Smith ER (1974) Barbiturate blockade of ovulation on days other than proestrus in the rat. *Neuroendocrinology* **14**: 212-223

Domínguez R, Riboni L, Zipitria D, Revilla R (1982) Is there a cholinergic circadian rhythm throughout the oestrous cycle related to ovulation in the rat?. *Journal of Endocrinology* **95**:175-180

Domínguez R, Zipitria D, Riboni L, Revilla R (1985) Differences in the ability of reserpine and chlorpromazine to block ovulation throughout the estrous cycle of the rat. *J Interdiscipl Cycle Res.* **16**: 63-72

Domínguez R, Cruz ME, Chavez R (1989) Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian. En: **Growth factors and the ovary**. Hirshfield, A. N. (Ed.), Serono symposia. Plenum Press. New York, pp. 321-325

Domínguez R, Chávez R, Cruz ME (1991) La regulación del crecimiento y del desarrollo del folículo ovárico. En: **Tópicos Selectos de Biología de la Reproducción**. Domínguez R. Coordinador. México, D.F., pp. 163-179

Dyer CA, Erickson GF (1985) Norepinephrine amplifies human chorionic gonadotropin-stimulated androgen biosynthesis by ovarian theca-interstitial cells. *Endocrinology* **116**: 1645-1652

Elvin JA, Clark AT, Wang P, Wolfman NM, Matzuk MM (1999) Paracrine actions of growth differentiation factor-9 in the mammalian ovary. *Molecular Endocrinology* **13**: 1035-1048

Erickson GF, Magofin DA, Dyer CA, Hofeditz C (1985) The ovarian androgen-producing cells: a review of structure/function relationships. *Endocrine Reviews* **6**: 371-399

Everett JW, Sawyer CH(1949) A neural timing factor in the mechanism by which progesterone advances ovulation in the cyclic rat. *Endocrinology* **45**: 581-595

Fawcett WD (1988) Tratado de Histología. 11^a. Ed. Interamericana. Mc. Graw-Hill, México. Pp. 858-878

Feder HH (1981) Estrous cyclicity in mammals. En: Neuroendocrinology of Reproduction. Chapter 10. N.T. Adler (Eds). Plenum Press. New York, pp.285

Fitzgerald M (1983) Capsaicin and sensory neurones- a review. *Pain* **15**: 109-130

Fortune JE (1994) Ovarian follicular growth and development in mammals. *Biology of Reproduction* **50**: 225-32

Gamse R, Wax A, Zigmond RE, Leeman SE (1981) Immunoreactive substance P in sympathetic ganglia: distribution and sensitive towards capsaicin. *Neuroscience* **6**: 437-441

George FW, Ojeda SR (1987) Vasoactive intestinal peptide enhances aromatase activity in the neonatal rat ovary before development of primary follicles or responsiveness to follicle-stimulating hormone. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA* **84**: 5803-7

Gerendai I, Nemeskéri Á (1983) The effect of unilateral vagotomy on compensatory ovarian hypertrophy and on the onset of puberty. En: Neuropeptides, Neurotransmitters and Regulation of Endocrine Proceses. E. Endroczi, L. Angeluci, U. Scapaganini, D. De Wied (Eds).Budapest, pp. 191-198

Gerendai I, Toth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I, Halasz B (1998) Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. *Neuroendocrinology* **68**: 244-256

Gerendai I, Tóth IE, Boldogkői Z, Medveczky I, Halász B (2000) CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of the Autonomic Nervous System* **80**: 40-45

Gilbert RFT, Mesón PC, Fahrenkrug J, Lee CM, Penman E, Wass J (1980) Axonal transport of neuropeptides in the cervical vagus nerve of the rat. *Journal Neurochemistry* **34**: 108-113

Gore-Langton RE, Armstrong DT (1994) Follicular steroidogenesis and its control. En: The Physiology of Reproduction. Vol. 1. Chapter 11. E. Knobil, J.D. Nelly (Eds). Raven Press. New York, pp. 610

Greenwald GS, Roy SK (1994) Follicular development and its control. En: The Physiology of Reproduction. Chapter 12. Knobil, J.D. Nelly (Eds). Raven Press, New York, pp. 629-724

Gwynne JT, Strauss JF (1982) The role of lipoproteins in steroidogenesis and cholesterol metabolism in steroidogenic glands. *Endocrine Reviews* **3**: 299-329

Hasumoto K, Sugimoto Y, Yamasaki A, Morimoto K, Kakizuka A, Negishi M, Ichikawa A (1997) Association of expression of mRNA encoding the PGF₂ alpha receptor with luteal cell apoptosis in ovaries of pseudopregnant mice. *Journal of Reproduction Fertility* **109**: 45-51

Hayashu M, McGee EA, Min G, Klein C, Rose UM, van Duin M, Hsueh AJW (1999) Recombinant growth differentiation factor-9 (GDF-9) enhances growth and differentiation of cultured early ovarian follicles. *Endocrinology* **140**: 1236-1244

- Hernández ER, Jiménez JL, Payne DW, Adashi EY (1988)** Adrenergic regulation of ovarian androgen biosynthesis is mediated via β -adrenergic theca-interstitial cell recognition sites. *Endocrinology* **122**: 1592-1602
- Hickey GJ, Chen SA, Besman MJ, Shively JE, Hall PF, Gaddy-Kurten D, Richards JS (1988)** Hormonal regulation, tissue distribution, and content of aromatase cytochrome P450 messenger ribonucleic acid and enzyme in rat ovarian follicles and corpora lutea: relationship to estradiol biosynthesis. *Endocrinology* **122**: 1426-36
- Hill TR (1962)** Paradoxical effects of ovarian secretion. En: **The Ovary**. Zuckerman y Weir (Eds.). Academic Press. New York, pp. 231-261
- Hirshfield AN, Midgley AR (1978)** Morphometric analysis of follicular development in the rat. *Biology of Reproduction* **19**: 597-605
- Holzer P (1991)** Capsaicin: cellular targets, mechanisms of action, and selectivity for thin sensory neurons. *Pharmacological Reviews* **43**: 143-201
- Holzer P (1998)** Neural Injury, Repair, and Adaptation in the GI Tract. II. The elusive action of capsaicin on the vagus nerve. *American Journal Physiology* **275**: G8-G13
- Hsueh AJ, Billig H, Tsafiriri A (1994)** Ovarian follicle atresia: a hormonally controlled apoptotic process. *Endocrine Reviews* **15**: 707-24
- Hsueh AJW, Erickson GF, Papkoff H (1983a)** Effect of diverse mammalian gonadotropins on estrogen and progesterone production by cultured rat granulosa cells. *Biochemical* **225**: 505-511

- Hsueh AJW, Jones PBC, Adashi EY, Wang C, Zhuang LZ, Welsh THJr (1983b)** Intraovarian mechanisms in the hormonal control of granulosa cell differentiation in rats. *Journal of Reproduction Fertility* **69**: 325-342
- Hunter RHF, Cook B, Baker TG (1985)** Intersexuality in five pigs, with particular reference to estrous cycle, the ovotestis, steroid hormone secretion and potential fertility. *Journal of Endocrinology* **106**: 233-242
- Hussein MR (2005)** Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. *Human Reproduction Update* **11**: 162-177
- Jancsó G, Kiraly E, Jancso-Gabor A (1977)** Pharmacologically induced selective degeneration of chemosensitive primary sensory neurones. *Nature* **270**: 741-743
- Kallo I, Butler JA, Barkovics-Kallo M, Goubillon ML, Coen CW (2001)** Oestrogen receptor beta-immunoreactivity in gonadotropin releasing hormone-expressing neurones: regulation by oestrogen. *Journal of Neuroendocrinology* **13**: 741-748
- Kawakami M, Kubo K, Uemura, T, Hayashi R (1981)** Involvement of ovarian innervation in steroid secretion. *Endocrinology* **109**: 136
- Kim IC, Schomberg DW (1989)** The production of transforming growth factor-beta activity by rat granulosa cell cultures. *Endocrinology* **124**: 1345-1351
- Kiso M, Manabe N, Komatsu K, Shimabe M, Miyamoto H (2003)** Abnormal structural luteolysis in ovary of the senescent accelerated mouse (SAM) expression of Fas ligand/Fas-mediated apoptosis signaling molecules in luteal cells. *Journal of Reproduction and Development* **49**: 457-463
- Klein CM, Burden HW (1988a)** Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. *Neuroscience Letters* **85**: 217-222

Klein CM, Burden HW (1988b) Substance P- and vasoactive intestinal polypeptide (VIP)-immunoreactive nerve fibers in relation to ovarian postganglionic perikarya in para- and prevertebral ganglia: evidence from combined retrograde tracing and immunocytochemistry. *Cell and Tissue Research* **252**: 403-410

Knobil E (1989) The GnRH pulse generator. En: **Control of the Onset of Puberty**. III. H.A. Delamare-van der Waal, T.M. Plant, G.P. Van Rees, J. Schedemaker (Eds). Excerpta Medica., Amsterdam, New York, Oxford. International Congress Series 861, pp- 11-20

Knobil E, Plant TM, Wildt L, Belchetz PE, Marshall G (1980) Control of the Rhesus monkey menstrual cycle: Permissive role of the hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science* **201**: 1371

Kordon C, Drouva SV, Martínez de la Escalera G, Weiner RI (1994) Role of classic and peptide neuromediators in the neuroendocrine regulation of luteinizing hormone and prolactin. En: **Physiology of Reproduction**. 2^a. Ed. Chapter 27. Knobil, J.D. Nelly (Eds). Raven Press. New York, pp 1621-1681

Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Haggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* **138**: 863-870

Kuranaga E, Kanuka H, Bannai M, Suzuki M, Nishihara M, Takahashi M (1999) Fas/Fas ligand system in prolactin-induced apoptosis in rat corpus luteum: possible role of luteal immune cells. *Biochemical and Biophysical Research Communication* **260**: 167-173

Laflamme N, Nappi RE, Drolet G, Labrie C, Rivest S (1998) Expression and neuropeptidergic characterization of estrogen receptors (ERalpha and ERbeta)

throughout the rat brain: anatomical evidence of distinct roles of each subtype. *Journal of Neurobiology* **36**: 357-378

Lawrence IE, Burden HW, Louis TM (1978) Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentration and fetal resorption. *Journal of Reproduction and Fertility* **53**: 131-136

Lawrence CP, Kristal MB, Komisaruk BR (1987) Sensory innervation of the external and internal genitalia of the female rat. *Brain Research* **408**: 199-204

Lawrence IE Jr, Burden HW (1980) The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. *The Anatomical Record* **196**: 51-59

Leung PC, Steele GL (1992) Intracellular signaling in the gonads. *Endocrine Reviews* **13**: 476-498

Lipner H (1988) Mechanism of mammalian ovulation. En: **The Physiology of Reproduction**. Chapter 12. E. Knobil, J.D. Nelly (Eds). Raven Press, New York, pp. 447-487

Luthman J, Strömberg I, Broding E, Jonson G (1989) Capsaicin treatment to developing rats induces increase of noradrenaline levels in the iris without affecting the adrenergic terminal density. *International Journal of Developing Neuroscience* **7**: 613-622

Magoffin DA, Gancedo B, Erickson GF (1989) Transforming growth factor-beta promotes differentiation of ovarian thecal-interstitial cells but inhibits androgen production. *Endocrinology* **125**: 1951-1958

- Magoffin DA, Weitsman SR** (1993) Insulin-like growth factor-I stimulates the expression of 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase messenger ribonucleic acid in ovarian theca-interstitial cells. *Biology of Reproduction* **48**: 1166-1173
- Mayerhofer A, Smith GD, Danilchik M, Levine JE, Wolf DP, Dissen GA, Ojeda SR** (1998) Oocytes are a source of catecholamines in the primate ovary: evidence for a cell-cell regulatory loop. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA* **95**: 10990-10995
- McGee EA, Hsueh AJW** (2000) Initial and cyclic recruitment of ovarian follicles. *Endocrine Reviews* **21**: 200-214
- McGrath SA, Esquela AF, Lee SJ** (1995) Oocyte-specific expression of growth/differentiation factor-9. *Molecular Endocrinology* **9**: 131-136
- McNeill DL, Burden HW** (1987) Neuropeptides in sensory perikarya projecting to the rat ovary. *The American Journal of Anatomy* **179**: 269-276
- Mione MC, Cavanagh JFR, Kirkpatrick KA, Burnstock G** (1992) Plasticity in expression of calcitonin gene-related peptide and substance P immunoreactivity in ganglia and fibres following guanethidine and/or capsaicin denervation. *Cell and Tissue Research* **268**: 491-504
- Mitchel GAG** (1988) The innervation of the ovary, uterine tube, testis and epididimus. *Journal Anatomical* **72**: 508-517
- Morales L, Chávez R, 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

- Morales L, Chávez R, Ayala ME, Domínguez R (1998)** Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. *The Journal of Endocrinology* **158**: 213-219
- Morales L, Betanzos R, Domínguez R (2004)** Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. *Archives of Medical Research* **35**: 279-283
- Morán C, Morales L, Quiróz U, Domínguez R (1998)** Efectos de la desnervación sensorial sobre la pubertad de la rata hembra. XXIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción 96-104
- Morán C, Morales L, Quiróz U, Domínguez R (2000)** Effects of the unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. *Journal of Endocrinology* **166**: 205-211
- Morán C, Morales L, Razo RS, Apolonio J, Quiróz U, Chavira R, Domínguez R (2003)** Effects of sensorial denervation induced by capsaicin injection at birth or on day three of life, on puberty, induced ovulation and pregnancy. *Life Sciences* **73**: 2113-25
- Morse AM, Van Wagenen G (1936)** Observations upon ovulation in primates. *American Journal of Obstetrics and Gynecology* **32**: 823-832
- Nance DW, King TR, Nance PW (1987)** Neuroendocrine and behavioral effects of intrathecal capsaicin in adult female rats. *Brain Research Bulletin* **18**: 109-114
- Niswender GD, Terry MN (1988)** The corpus luteum and its control. En: **The Physiology of Reproduction**. Chapter 13. Knobil E. Y Nelly J.D. Raven Press, New York, pp. 489-525

- Ny T, Bjersing L, Hsueh AJ, Loskutoff DJ (1985)** Cultured granulosa cells produce two plasminogen activators and an antiactivator, each regulated differently by gonadotropins. *Endocrinology* **116**:1666-1668
- O'Connell ML, Canipari R, Strickland S (1987)** Hormonal regulation of tissue plasminogen activator secretion and mRNA levels in rat granulosa cells. *The Journal of Biological Chemistry* **262**: 2339-2344
- Ojeda SR, White SS, Aguado IL, Advis JP, Andersen JM (1983)** Abdominal vagotomy delays the onset of puberty and inhibits ovarian function in the female rat. *Neuroendocrinology* **36**: 261-267
- Ojeda SR, Costa ME, Katz KH, Hersh LB (1985)** Evidence for the existence of substance P in the prepubertal rat ovary. I. Biochemical and physiologic studies. *Biology of Reproduction* **33**: 286-295
- Papka RE, Cotton JP, Traurig HH (1985)** Comparative distribution of neuropeptide tyrosine-vasoactive intestinal polypeptide-, substance P-immunoreactive, acetylcholinesterase-positive and noradrenergic nerves in the reproductive tract of the female rat. *Cell and Tissue Research* **242**: 475-490
- Pedernera E (1993)** Cooperación celular en la biosíntesis de hormonas esteroides. En: **Comunicación neuroendocrina. Bases Celulares y Moleculares**. Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, México, pp. 33-46
- Pitzel L, Jarry H, Wuttke W (1991)** Effects of substance-P and neuropeptide-Y on in vitro steroid release by porcine granulosa and luteal cells. *Endocrinology* **129**:1059-1065

- Potashnik G, Insler V, Meizner I, Sternberg M** (1987) Frequency, sequence, and side of ovulation in women menstruating normally. *British Medical Journal (Clinical Research Ed.)* **294**:219
- Richards JS** (1978) Hormonal control of follicular growth and maturation in mammals. En: The Vertebrate Ovary. Comparative Biology. R.E. Jones Ed. Plenum Press, New York, pp. 331-360
- Richards JS** (1980) Maturation of ovarian follicles: actions and interactions of pituitary and ovarian hormones of follicular cell differentiation. *Physiological Reviews* **60**: 51-89
- Richards JS, Jahnsen T, Hedin L, Lifka J, Ratoosh S, Durica JM, Goldring NB** (1987) Ovarian follicular development: from physiology to molecular biology. *Recent Progress in Hormone Research* **43**:231-276
- Ross GT** (1990) Follicular development: the life cycle of the follicle and puberty. En: Control of the Onset of Puberty. Chapter 17. M.M. Grumbach, P.C. Sizonenko, M.L. Aubert Williams (Eds). Baltimore Maryland. U.S.A., pp. 376-386
- Schally AV, Arimura A, Kastin AJ** (1973) Hypothalamic regulatory hormones. *Science* **179**: 341-350
- Schally AV, Kastin AJ** (1971) Hypothalamic neuroendocrine mediators. *Physiological Reviews* **22**: 5-19
- Schicho R, Kanai Y, Ishikawa T, Skofitsch G, Donnerer J** (1998) Involvement of NGF in the induction of increased noradrenergic innervation of the ureter in neonatally capsaicin-treated rats. *Journal of the Autonomic Nervous System* **73**: 46-53

Segaloff DL, Wang HY, Richards JS (1990) Hormonal regulation of luteinizing hormone/chorionic gonadotropin receptor mRNA in rat ovarian cells during follicular development and luteinization. *Molecular Endocrinology* **4**: 1856-1865

Silverman AJ, Krey LC, Zimmerman EA (1979) A comparative study of the luteinizing hormone releasing hormone (LHRH) neural networks in mammalian. *Biology of Reproduction* **20**: 98-110

Silverman AJ, Liben Y, Witkin JW (1994) The gonadotropin releasing hormone (GnRH) neuronal system: Immunocytochemistry and in situ hybridization. En; **Physiology of Reproduction**, Chapter 28. E. Knobil, J.D. Nelly. (Eds) 2^a. Ed. Raven Press. New York, pp. 1683-1709

Skinner MK, Keski-Oja J, Osteen KG, Moses HL (1987) Ovarian thecal cells produce transforming growth factor-beta which can regulate granulosa cell growth. *Endocrinology* **121**: 786-792

Stefenson A, Owman Ch, Sjöberg NO, Spörrong B, Walls B (1981) Comparative study of the autonomic innervation of the mammalian ovary with particular regard to the follicular system. *Cell Tissue Research* **215**: 47-52

Steinkampf MP, Mendelson CR, Simpson ER (1988) Effects of epidermal growth factor and insulin-like growth factor I on the levels of mRNA encoding aromatase cytochrome P-450 of human ovarian granulosa cells. *Molecular and Cellular Endocrinology* **59**: 93-99

Szallasi A, Blumberg PM (1999) Vanilloid (Capsaicin) receptors and mechanisms. *Pharmacological Reviews* **51**: 159-212

Terenghi G, Zhang SQ, Unger WG, Polak JM (1986) Morphological changes of sensory CGRP-immunoreactive and sympathetic nerves in peripheral tissues following chronic denervation. *Histochemistry* **86**: 89-95

Traurig H, Saria A, Lembeck F (1984) The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology* **327**: 254-259

Trauring HH, Papka RE, Rush ME (1988) Effects of capsaicin on reproductive function in the female rat: Role of peptide-containing primary afferent nerves innervating the uterine cervix in the neuroendocrine copulatory response. *Cell Tissue Research*. **253**: 573-581

Trujillo A, Morales L, Domínguez R (2002) Effects of capsaicin administration into the bursa ovarica in the regulation of ovarian functions. The Third Five Annual Meeting of Society for the Study of Reproduction. Baltimore. USA, July 28-31. *Biology of Reproduction* **66**: 207

Trujillo A, Morales L, Domínguez R (2003) The effects of the capsaicin (CAP) treatment on the ovarian function, depends on the day of the estrous cycle. The XXXV Congresso da Sociedade Brasileira de Fisiologia & XXI Congresso da Associação Latino Americana de Ciências Fisiológicas-ALACF. Riberirão Preto-SP, Brasil, September 1-4, 175

Trujillo A, Morales L, Vargas X, Alba L, Domínguez R (2004) Effects of capsaicin treatment on the regulation of ovarian compensatory hypertrophy and compensatory ovulation. *Endocrine* **25**: 155-162

- Tresguerres JAF** (1992) Fisiología del ovario. En: **Fisiología Humana**. Cap. 83. Interamericana. McGraw-Hill, España, pp. 1060-1072
- Wang HS, Chard T** (1999) IGFs and IGF-binding proteins in the regulation of human ovarian and endometrial function. *The Journal of Endocrinology* **161**: 1-13
- Wardle KA, Ranson J, Sanger GJ** (1997) Pharmacological characterization of the vanilloid receptor in the rat dorsal spinal cord. *British Journal of Pharmacology* **121**: 1012-1016
- Winterhalter EH** (1896) Ein sympathisches ganglion inm menschlichen ovarium. *Archives of Gynakology* **51**: 49-55
- Wray S, Grant P, Gainer E** (1989) Evidence that cells expressing luteinizing hormone-releasing hormone mRNA are derived from progenitor cells in the olfactory placode. *Proceedings of the National Academy Sciences of USA*. **86**: 8132-8136
- Young FM, Illingworth PJ, Frase HM** (1998) Ubiquitin and apoptosis in the corpus luteum of the marmoset monkey (*Callithrix jacchus*). *Journal of Reproduction and Fertility* **114**: 163-168
- Zoubina EV, Fan Q, Smith PG** (1998) Variations in uterine innervation during the estrous cycle in rat. *The Journal of Comparative Neurology* **397**: 561-571

Endocrine

 HUMANA PRESS

VOLUME 25
NUMBER 2
NOVEMBER 2004

Featured Inside

Diabetic Cardiomyopathy:
Do Women Differ From Men?

The Effect of Global Brain Ischemia
in Normal and Diabetic Animals:
*The Influence of Calcium
Channel Blockers*

Src Tyrosine Kinase Regulates
CYP17 Expression
and Androstenedione Secretion
in Theca-Enriched Mouse
Ovarian Cells

Indexed and Abstracted In:

- Index Medicus®/Medline®
- Current Contents®/Life Sciences
- Biological Abstracts®/Biosis®
- EMBASE®/Excerpta Medica®
- Chemical Abstracts®
- Reference Update® • CABS®

Humanajournals.com
Search, Read, and Download

Effects of Capsaicin Treatment on the Regulation of Ovarian Compensatory Hypertrophy and Compensatory Ovulation

Angélica Trujillo,^{1,2} Leticia Morales,¹ Xiomara Vargas,² Leticia Alba,² and Roberto Domínguez¹

¹Unidad de Investigación en Biología de la Reproducción, Facultad de Estudios Superiores Zaragoza, UNAM, México; and

²Escuela de Biología, BUAP, Edificio 76 Ciudad Universitaria, CP 72570, Puebla, Pue. México

The present study investigates the effects of functional sensorial denervation, induced by administering capsaicin to hemiovariectomized adult female rats in each day of the estrus cycle, on ovulation and serum concentrations of estrogen and progesterone. The results indicate that the establishment of compensatory ovarian hypertrophy (COH) and compensatory ovulation (CO) depends on both the day of the estrous cycle when sensorial denervation was performed and on which ovary was extirpated. These results support the now accepted notion that the response of the ovaries to denervation is asymmetrical. The results seem to suggest that this asymmetric response is mediated by some specific neural information that is registered in the ovary and sent to the CNS, that such information plays a role modulating the reactivity of the ovarian compartments to gonadotropins, and that the frequency of this signal varies along the estrus cycle.

Key Words: Hemiovariectomy; steroid secretion; ovarian compensatory hypertrophy; neuroendocrinology.

Introduction

Hemiovariectomy is, by now, an experimental paradigm widely used by researchers studying neural connections between the ovaries and the central nervous system (CNS). The effects of hemiovariectomy in mammals can be analyzed in terms of compensatory hypertrophy by the *in situ* ovary, enhanced follicular activity, and an increase in both the number of ova shed and the number of corpora lutea (1). The mechanisms involved in compensatory ovarian hypertrophy (COH) and compensatory ovulation (CO) in hemiovariectomized rats have been analyzed through changes in the secretion rates of gonadotropins, by the pituitary, and of steroids, by the ovaries (1). There is evidence, however, that a direct neural mechanism is involved in modulating

COH and CO (2–6). Such modulation is achieved by at least two distinct neural pathways: the parasympathetic (vagus nerve) and sympathetic (the superior ovarian nerve and ovarian plexus) systems (3,4,7).

According to Chávez et al. (3), bilateral abdominal vagotomy to right hemiovariectomized rat reduces COH, while sectioning the left vagus nerve induces different effects that vary according to the ovary remaining *in situ*. In right hemiovariectomized rats (left ovary *in situ*) ovulation rates, COH and the number of ova shed by ovulating animals increased after left-side vagotomy, while the same procedure to left hemiovariectomized rats (right ovary *in situ*) induces a decrease in all parameters evaluated.

In the adult rat, the participation of the ovary's noradrenergic innervation in COH depends on the day of the estrous cycle when hemiovariectomy and denervation are performed (4). In the pre-pubertal rat, the participation of the innervation depends on the age of the rat at which surgery is performed (6).

Several studies indicate that the information pathways connecting the CNS and the ovaries involve sensory innervation, and that from the ovary to the CNS, this information is carried by the vagus nerve (8,9) and the ovarian plexus (10,11).

The sensory nerves innervating the ovary contain various neurotransmitters, such as substance P (SP) (12–14), vaso-intestinal peptide (VIP), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) (11,15,16). The sensory fibers innervating the ovary are classified as unmyelinated or C-type primary afferent nerves. In the rat, the sensory fibers are permanently destroyed by treatment with the neurotoxin capsaicin (17).

According to Nance et al. (18), intrathecal capsaicin treatment had no effect on the estrous cycle, COH, or female sexual behavior of treated rats. However, these researchers found that capsaicin-treated animals showed a dramatic reduction in their fertility rates, which was found to be due to the reduced capacity of the vaginal–cervical stimulation to produce the decidual response.

Morán et al. (19) found that injecting capsaicin to pre-pubertal rats results in a decrease in the number of ova shed at first estrus. No differences in the levels of estradiol and progesterone between control and treated animals were observed. When hemiovariectomy was performed to 28-d-old rats, the group of pre-pubertal rats treated with capsaicin at

Received August 17, 2004; Revised November 5, 2004; Accepted November 8, 2004.

Author to whom all correspondence and reprint requests should be addressed: Angélica Trujillo, Escuela de Biología, Universidad Autónoma de Puebla, Edificio 76, Ciudad Universitaria, C.P. 72570, Puebla Pue., México. E-mail: atrujillo@hotmail.com

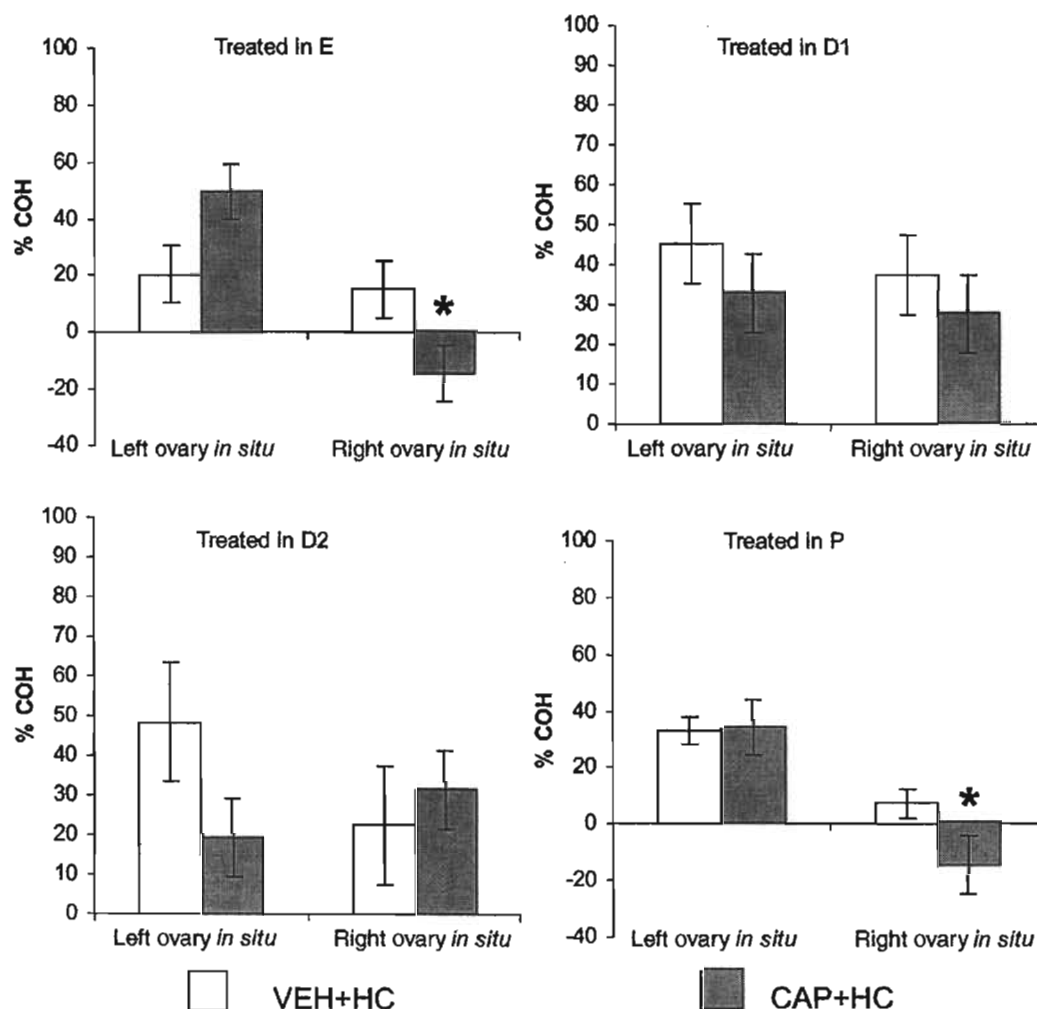


Fig. 1. Percentage (mean \pm SEM) of ovarian compensatory hypertrophy (COH) by left or right ovary, in animals treated with vehicle (VEH) or capsaicin (CAP), in estrus (E), diestrus 1 (D1), diestrus 2 (D2), or proestrus (P). The animals were sacrificed the day of estrus, after presenting three consecutive 4-day cycles. * $p < 0.05$ vs VEH+HC Right ovary *in situ* (chi square test).

birth showed significantly higher COH by the left ovary than vehicle-treated animals did. Capsaicin treatment did not modify progesterone serum levels to animals with the right ovary *in situ*, but were significantly lower when the right ovary was extirpated.

The aim of the present study was to evaluate the participation of the sensorial ovarian innervation, in hemiovariectomized adult female rats, on regulating COH, CO, and the concentrations of estradiol and progesterone in serum. The evaluation was based on the effects of capsaicin treatment to adult rats. According to Trujillo et al. (20), the effects of capsaicin treatment vary according to the day of the estrous cycle when the drug is injected. Consequently, we analyzed the hypothesis that neuroendocrine conditions regulating ovarian responses to hemiovariectomy vary along the estrous cycle, and that sensory denervation modifies the reactivity of the ovary *in situ*, depending also on the day of the estrous cycle when denervation is performed.

Results

Percentage of the Compensatory Ovarian Hypertrophy (COH)

In rats with the left ovary *in situ*, the COH was similar between control (vehicle-injected) animals and denervated (capsaicin-treated) groups injected with capsaicin, regardless of the day of treatment (estrus, diestrus 1, diestrus 2, or proestrus).

When the right ovary was *in situ*, the COH of rats treated with capsaicin on estrus or proestrus was lower than in rats injected with vehicle solution. Such differences, between the denervated and control rats, were not observed when capsaicin was injected on diestrus 1 or diestrus 2 (Fig. 1).

Number of Ova Shed and Percentage of Compensatory Ovulation (CO)

When left or right hemiovariectomy was performed on adult rats injected with capsaicin on diestrus 2 or proestrus,

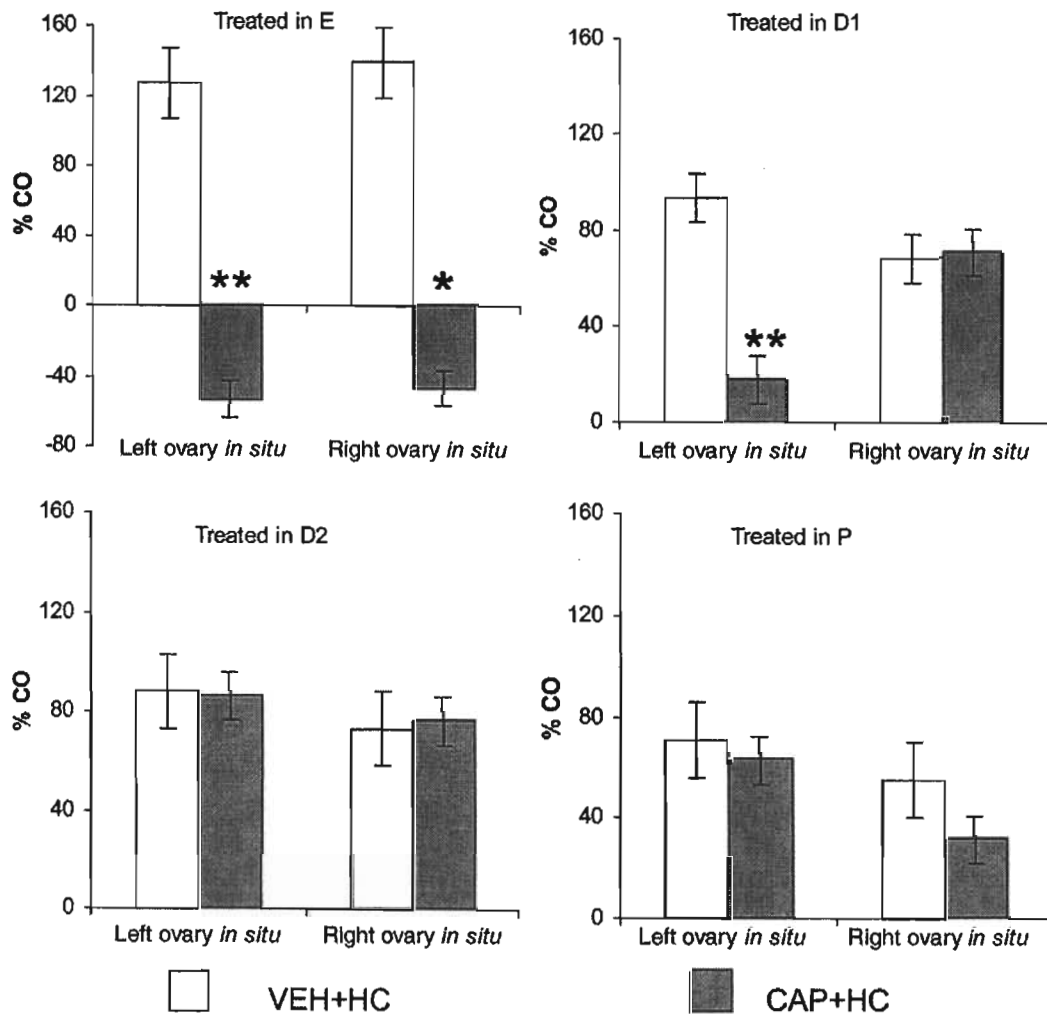


Fig. 2. Percentage (mean \pm SEM) of compensatory ovulation (CO) by left or right ovary, in animals treated with vehicle (VEH) or capsaicin (CAP), in estrus (E), diestrus 1 (D1), diestrus 2 (D2), or proestrus (P). The animals were sacrificed the day of estrus, after presenting three consecutive 4-d cycles. * $p < 0.05$ vs VEH+HC Right ovary *in situ* (chi square test), ** $p < 0.05$ vs VEH+HC Left ovary *in situ* (chi square test).

CO (Fig. 2) and the number of ova shed were similar to vehicle-treated rats (Table 1).

However, when the left ovary was *in situ*, the CO of rats treated with capsaicin in diestrus 1 or estrus was significantly lower than in vehicle-treated animals. Treatment with capsaicin on the day of estrus, followed by left or right hemiovariectomy, resulted in a significantly lower CO than that of vehicle-treated animals (Fig. 2).

Estradiol and Progesterone Serum Levels

The results of the estradiol and progesterone serum levels in the different experimental groups are shown on Figs. 3 and 4.

1. Rats with the left ovary *in situ*. Compared to vehicle-treated animals, estradiol serum levels were significantly higher in rats treated with capsaicin at diestrus 1. No significant differences, between vehicle and capsaicin-treated rats in

diestrus 2, proestrus, or estrus were observed in estradiol serum levels (Fig. 3). No significant differences in progesterone serum levels were observed either (Fig. 4).

2. Rats with the right ovary *in situ*. Compared to vehicle-treated animals, estradiol serum levels were significantly higher in rats treated with capsaicin at estrus. No significant differences in estradiol serum levels were observed between vehicle and capsaicin-treated rats in diestrus 1, 2, or proestrus (Fig. 3). Rats treated with capsaicin in proestrus had significantly higher levels of progesterone than the vehicle-treated group. Such differences in progesterone serum levels were not observed when treatments were done on diestrus 1, diestrus 2, or estrus (Fig. 4).

Histological Observation

The histological analysis of the corpora lutea of hemiovariectomized adult rats injected with vehicle on diestrus 1 day showed healthy cells, with large nuclei, and numerous

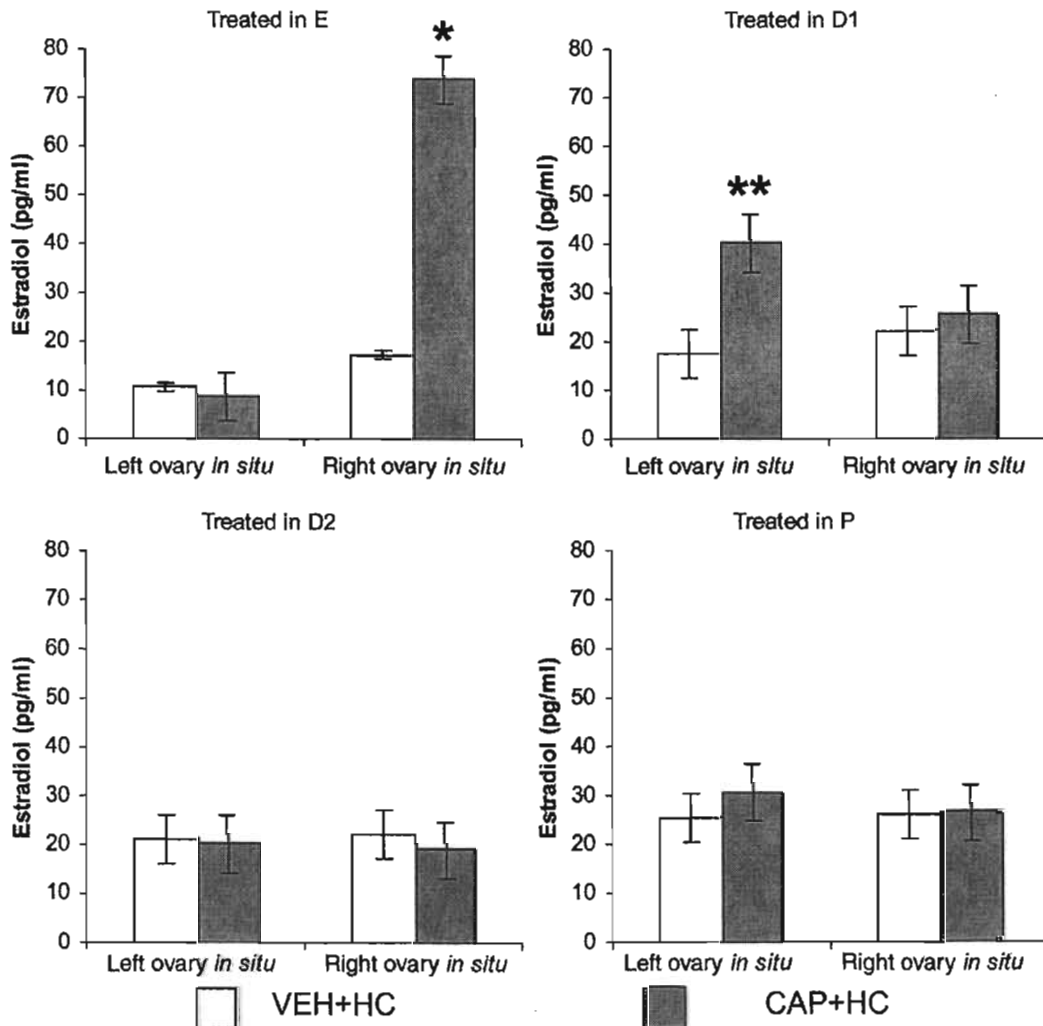
Table 1
Mean \pm SEM of Number of Ova Shed
by the Left or Right Ovary, in Animals Treated with Vehicle (VEH)
or Capsaicin (CAP), in Diestrus 1 (D1), Diestrus 2 (D2), Proestrus (P) or Estrus (E)^a

Group	Ovary <i>in situ</i>	Ova shed	Ovary <i>in situ</i>	Ova shed
Treated in E				
VEH+HC	Left	6.1 \pm 1.04	Right	6.3 \pm 1.85
CAP+HC	Left	4.6 \pm 1*	Right	4.3 \pm 1.24**
Treated in D1				
VEH+HC	Left	6.8 \pm 0.5	Right	6.7 \pm 0.5
CAP+HC	Left	4.5 \pm 0.3*	Right	4.8 \pm 0.3**
Treated in D2				
VEH+HC	Left	6 \pm 0.3	Right	6 \pm 0.3
CAP+HC	Left	6.2 \pm 0.3	Right	6.2 \pm 0.3
Treated in P				
VEH+HC	Left	6.3 \pm 0.7	Right	6 \pm 0.6
CAP+HC	Left	6.5 \pm 0.6	Right	6.3 \pm 0.6

* p < 0.05 vs VEH+HC Left ovary *in situ*. Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test.

** p < 0.05 vs VEH+HC Right ovary *in situ*. Chi square test. Kruskal-Wallis test followed by Mann-Whitney U test.

^aThe animals were sacrificed the day of estrus, after presenting three consecutive 4-d cycles.



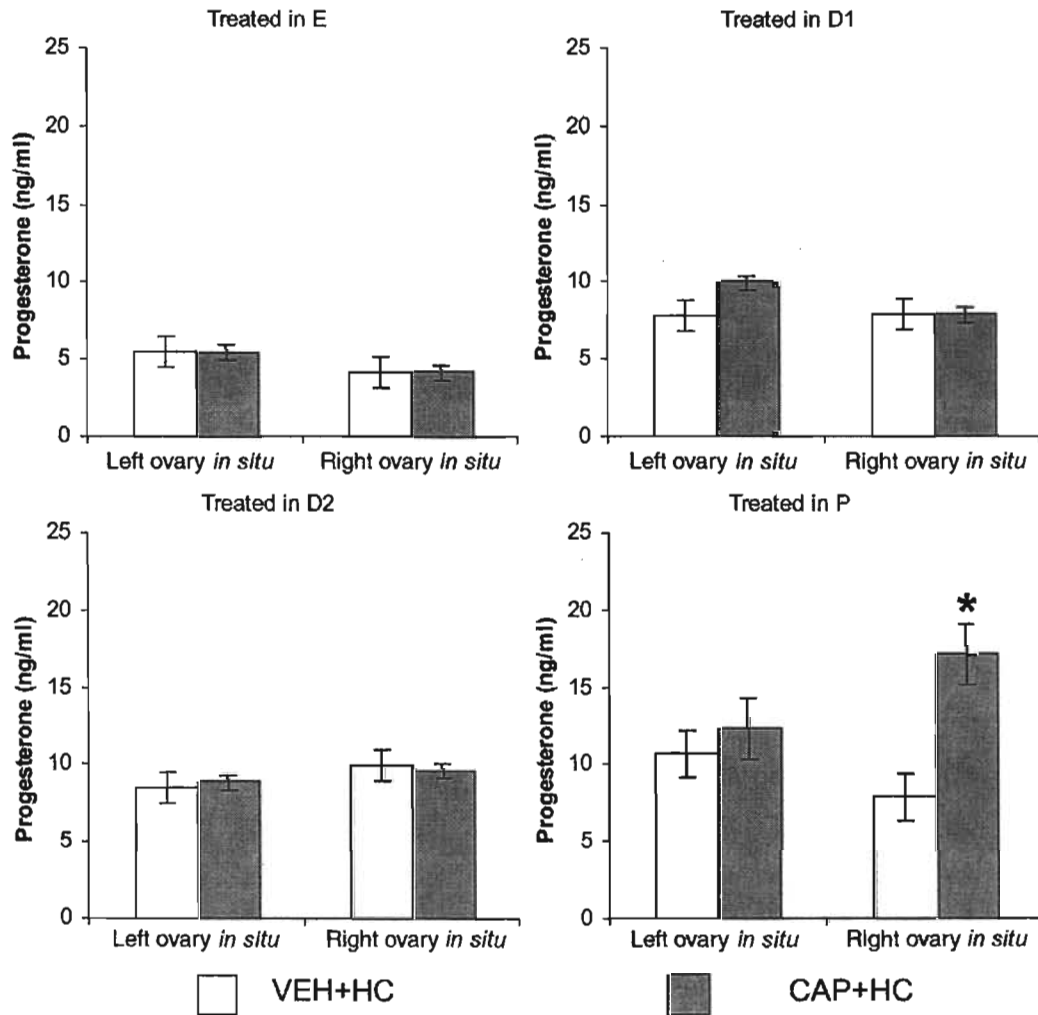


Fig. 4. Serum concentration (mean \pm SEM) of progesterone (ng/mL) in animals treated with vehicle (VEH) or capsaicin (CAP), in estrus (E), diestrus 1 (D1), diestrus 2 (D2), or proestrus (P) and hemiovariectomy (HC) of the right or left ovary. The animals were sacrificed the day of estrus, after presenting three consecutive 4-d cycles. * $p < 0.01$ vs VEH+HC Right ovary *in situ*. ANOVA followed by Tukey's test.

well-vascularized mitotic cells [fresh corpora lutea (21)]. The corpora lutea of denervated animals had larger cytoplasmic vacuoles, and showed a drop in the number of capillaries and an increase in dense connective tissue [old corpora lutea (21)].

Compared to the vehicle-treated group, animals treated with capsaicin in diestrus 1 and hemiovariectomized in diestrus 1 showed a drop in the number the follicles present in the ovary. The follicles present in the ovaries of animals denervated on diestrus 1 showed the presence of pyknosis in the granulosa cell, granulosa cells in the follicular fluid, and hypertrophy of the theca cells.

Discussion

The present results suggest that the sensorial innervation of the ovary participates in ovarian reactivity to neuroendocrine regulating mechanisms, both in intact animals (20) and when one of the ovaries is extirpated. In both, the participation of the sensorial innervation varies along the estrus cycle.

According to Nance et al. (18), injecting capsaicin intrathecal to hemiovariectomized adult rats had no apparent effect on COH. The differences in COH changes between Nance et al. and present results could be related to which ovary was removed [it was not specified by Nance et al. (18)],

Fig. 3. (Opposite page) Serum concentration (mean \pm SEM) of estradiol (pg/mL) in animals treated with vehicle (VEH) or capsaicin (CAP), in estrus (E), diestrus 1 (D1), diestrus 2 (D2), or proestrus (P) and hemiovariectomy (HC) of the right or left ovary. The animals were sacrificed the day of estrus, after presenting three consecutive 4-d cycles. * $p < 0.01$ vs VEH+HC Right ovary *in situ*. ANOVA followed by Tukey's test. ** $p < 0.05$ vs VEH+HC Left ovary *in situ*. ANOVA followed by Tukey's test.

the day of the estrous cycle when surgery was performed, and the via used to inject the drug (intrathecal and subcutaneous).

Several studies propose that the sensorial innervation of the ovary obtains information on ovarian functions through receptors localized around the follicles; that this information is conveyed to the hypothalamic and extra-hypothalamic centers by neural pathways, and that the afferent ovarian innervation is involved in regulating the response of the ovarian follicle to gonadotropins (9,22–24). In addition, Gerendai et al. (9) found that the neural routes by which sensory signals arising from the ovaries reach the hypothalamus include the vagi nerves.

In the adult rat, the participation of the noradrenergic ovary innervation in COH depends on the day of the estrus cycle when hemiovariectomy and denervation are performed (4), suggesting that there are significant changes in the neural mechanisms regulating the modulatory effects made by the ovarian innervation on the performance of the gonad. Present results agree with such idea.

Differences in CO and COH, between the right and left ovaries, have been described in humans (25), pigs (26), and monkeys (27). In the rat, these differences are associated with the number of ova shed by the right and left ovaries, and such differences are related to ovarian innervation (4, 28), and the age of the animal when hemiovariectomy is performed (6). Present results support the idea that the ovarian sensorial innervation participates in modulating CO and COH.

Capsaicin treatment resulted in changes in CO and COH, and, as with estradiol and progesterone serum concentrations, the changes in CO and COH depend of the day of the estrous cycle when treatment was performed. Chávez et al. (3) showed that the CO in right or left unilaterally ovariectomized rats, with unilateral or bilateral section of the vagus nerve, was normal when compared to the control group; however, these animals showed lower COH.

Morán et al. (19) showed that when hemiovariectomy was performed in newborn capsaicin-treated animals, the CO by the right ovary was significantly higher than in vehicle-injected animals. When the left ovary was left *in situ*, CO from the *in situ* ovary was significantly lower than in vehicle-injected animals. COH was similar in vehicle-treated and hemiovariectomy capsaicin-treated animals.

Our results and those presented by Moran et al. (19), suggest that the left and right ovaries provide different information to the central nervous system. It is possible that in unilaterally ovariectomized animals, the neuroendocrine systems controlling ovarian compensatory growth and ovulation are organized differently, depending on whether the neural information arises from the left or right ovary and arrives at the left or right hypothalamus.

There is no direct evidence showing that the sensorial innervation participates in regulating steroid biosynthetic pathways *in vivo*. However, Morán et al. (19) showed that,

compared with vehicle-treated rats, capsaicin-treated rats hemiovariectomized at 20 d of age showed significantly lower progesterone serum levels when the right ovary was left *in situ*, also that the ability of the right and left ovary to secrete estradiol is different.

In capsaicin-treated animals we observed an increment in serum estrogen concentration, an increment that could result from the increased content of norepinephrine in the ovaries of these animals. In this study we did not measure ovarian norepinephrine concentration, but results from our laboratory show that in the adult rat capsaicin administration into the bursa resulted in an increase in ovarian norepinephrine content when the treatment was in diestrus 1 (diestrus 1: 6.1 ± 1.1 vs 1.9 ± 0.3 $p < 0.05$) (20). Thus, the increase in estradiol serum concentration in denervated female rats may result from the plausible increment in norepinephrine. There is evidence that norepinephrine has a stimulatory effect on the estrogen secretion by the ovaries (28–30).

The results presented herein suggest that in hemiovariectomized adult rats the sensory innervation participates in the steroid biosynthetic pathways *in vivo*, by inhibiting the modulation of estradiol and progesterone secretion, and that such participation is different for each ovary and varies along the estrous cycle. There is evidence that capsaicin alters the sensory nerves containing SP, VIP, and CGRP (11–16). These peptides play a role in the communication between primary sensory neurons and other neuronal and nonneuronal cells. Thus, it is possible that capsaicin treatment's effect on progesterone and estradiol serum levels reflect the effects on the secretion of other peptides. Based on the present results, and those available in the primary literature, we propose that capsaicin treatment affects estradiol and progesterone secretion via the sensory–sympathetic reflex.

The different ovarian response to hemiovariectomy between pre-pubertal and adult animals could be related to norepinephrine concentration at the day of estrus between rats sacrificed at the day of first vaginal estrus (4) and adult rats sacrificed at the day of estrus (0.67 ± 0.06 vs 1.9 ± 0.3) (20).

Finally, the results presented herein support the concept of asymmetry in the response of the ovaries to denervation. These differences can be explained by the different information conveyed by the left and right ovaries to the CNS. Once in the CNS, such information participates in regulating the gonadotropin-secretion mechanism. Neuronal signals carried by the sympathetic innervation, projecting to the right and left ovaries, modulate the reactivity of the ovarian compartments to gonadotropins, and as shown, its participation varies along the estrus cycle.

Materials and Methods

All experiments were carried out in strict accordance with the Guide for Care and Use of Laboratory Animals at the National Academy of Science. The protocols were approved by the FES Zaragoza.

Table 2
Schematic Representation
of the Distribution of the Animals in the Experiments

Treatments			Hemiovariectomy left ovary <i>in situ</i>		Hemiovariectomy right ovary <i>in situ</i>	
D 1	12	VEH	D1	6	D1	6
D 2	12	VEH	D2	6	D2	6
P	12	VEH	P	6	P	6
E	12	VEH	E	6	E	6
D 1	12	CAP	D1	6	D1	6
D 2	12	CAP	D2	6	D2	6
P	12	CAP	P	6	P	6
E	12	CAP	E	6	E	6

Animals and Treatment

Adult female rats from the CIIZ-V strain (230–260 g) that had shown at least three regular estrous cycles monitored by cytological examination of daily vaginal smears, were used in this study. All animals were housed in an artificial light–dark cycle (lights on 05.00 to 19.00 h) with access to food and water *ad libitum*. All the treatments were performed between 09.00 and 11.00 h. Capsaicin (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) was dissolved in 10% ethanol, 10% Tween 80, and 80% saline solution.

Five microliters of vehicle, or 50 mg/kg, of capsaicin was injected subcutaneously to rats in diestrus 1, diestrus 2, proestrus, or estrus.

In Table 2 we include a schematic representation of the distribution of animals per treatment.

After presenting three consecutive 4-d cycles, the rats were anesthetized with ether, laparotomized, and either the right of left ovary was extirpated on the same day of the estrous cycle when they were treated with vehicle or capsaicin. The extirpated ovary was immediately weighed in a precision balance. After hemiovariectomy, the estrous cycle was monitored by daily smears. After presenting three consecutive 4-d cycles, the animals were sacrificed on the morning of the day of estrus.

Autopsy Procedure

Animals were killed by decapitation. The blood of the trunk was collected, allowed to clot at 4°C, and centrifuged at 970.6g. The serum was stored at –20°C, until estradiol and progesterone were measured by specific radioimmunoassay (RIA), with kits purchased from Diagnostic Products (Los Angeles, CA, USA). The intra- and interassay coefficients of variation were 2.1% and 5.6% for progesterone, and 6.0% and 7.1% for estradiol, respectively. At autopsy, the oviducts were dissected and the number of ova counted with the aid of a dissecting microscope. The remaining ovary was dissected and weighed in a precision balance.

Compensatory ovulation (CO) and ovarian compensatory hypertrophy (COH) were calculated as previously described

by Chávez et al. (3), and Cruz et al. (31). In brief, CO = [(number of ova shed by the *in situ* ovary – number of ova shed by the control)/number of ova shed by the control] × 100; and COH = [(weight of the ovary *in situ* – weight of the extirpated ovary)/weight of the extirpated ovary] × 100.

Histological Analysis

For histological analysis, ovaries were fixed in Bouin's solution, embedded in paraffin wax, serially sectioned at a thickness of 10 µm, and stained with hematoxylin–eosin. All sections from three randomly chosen ovaries of rats treated with capsaicin in D1 day were examined microscopically. For comparison purposes, three ovaries from the vehicle-injected group were also examined. Follicles were identified as healthy or atretic. Follicles having one of the following characteristics were considered atretic: the presence of pyknotic nuclei in the granulosa cell, granulosa cells present in the follicular fluid, or hypertrophy of the theca cells.

Statistical Analyses

Data on the number of ova shed were analyzed by Kruskal–Wallis test, followed by Mann–Whitney *U* test. Data on the estradiol and progesterone concentrations in serum were analyzed using variance analysis (ANOVA), followed by Tukey's test. When two means were compared, a Student's "*t*" test was used. The percentage of CO and COH were analyzed by chi square test. A probability of less than 5% was considered significant.

Acknowledgments

This work was supported by PAPIIT IN201702 and CONA CyT grant 40300 A-1. We are very grateful to Biol. Roberto Chavira for determining hormone levels in serum, and with Bioterio "Claude Bernard" BUAP for giving us the animals for this research. The English revision by M.Sc. Álvaro Domínguez-González is gratefully appreciated.

References

- Greenwald, G. S. and Roy, S. K. (1994). In: *The physiology of reproduction: follicular development and its control*. Knobil, E. and Neild, J. D. (eds.). Raven Press: New York.
- Burden, H. W. and Lawrence, I. E. J. R. (1977). *Neuroendocrinology* **23**, 368–378.
- Chávez, R., Cruz, M. E., and Domínguez, R. (1987). *J. Endocrinol.* **113**, 397–401.
- Chávez, R. and Domínguez, R. (1994). *J. Endocrinol.* **140**, 197–201.
- Gerendai, I., Marchetti, B., Maueri, S., Amico-Roxas, M., and Scapagnini, V. (1978). *Neuroendocrinology* **27**, 272–278.
- Morales, L., Chávez, R., and Domínguez, R. (1993). *Med. Sci. Res.* **21**, 15–17.
- Barco, A. I., Flores, A., Chavira, R., Damián-Matsumura, P., Domínguez, R., and Cruz, M. E. (2003). *Endocrine* **21**, 209–215.
- Gerendai, I. and Motta, T. (1998). *Endocrinol. Exp.* **35**, 332.
- Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkői, Z., Medveczky, I., and Halász, B. (2000). *J. Auton. Nervous Sys.* **80**, 40–45.
- Burden, H. W., Lawrence, I. E. Jr., Louis, M. T., and Hodson, C. A. (1983). *Neuroendocrinology* **37**, 288–290.

11. Klein, C. M. and Burden, H. W. (1988). *Neurosci. Lett.* **85**, 217–222.
12. Dees, W. L., Ahmed, C. E., and Ojeda, S. R. (1986). *Endocrinology* **119**, 638–641.
13. Ojeda, S. R., Costa, M. E., Katz, K. H., and Hersh, L. B. (1985). *Biol. Reprod.* **33**, 286–295.
14. Papka, R. E., Cotton, J. P., and Trauring, H. H. (1985). *Cell Tissue Res.* **242**, 475–490.
15. Calka, J., McDonald, J. K., and Ojeda, S. R. (1988). *Biol. Reprod.* **39**, 1215–1223.
16. McNeill, D. L. and Burden, H. W. (1987). *Am. J. Anat.* **179**, 269–276.
17. Urban, L. and Papka, R. E. (1985). *J. Auton. Nerv. Syst.* **12**, 321–333.
18. Nance, D. W., King, T. R., and Nance, P. W. (1987). *Brain Res. Bull.* **18**, 109–114.
19. Morán, C., Morales, L., Razo, R. S., et al. (2003). *Life Sci.* **73**, 2113–2125.
20. Trujillo, A., Morales, L., and Domínguez, R. (2002). *Biol. Reprod.* **66**, 207.
21. Buño, W., Carlevaro, E., Riboni, L., et al. (1975). *J. Endocrinol.* **66**, 233–237.
22. Domínguez, R. and Riboni, L. (1971). *Neuroendocrinology* **7**, 164–170.
23. Domínguez, R., Cruz, M. E., and Chávez, R. (1989). In: *Growth factors and the ovary: differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation*. Hirshfield, A. H. (ed.). Plenum Press: New York.
24. Morán, C., Morales, L., Quiróz, U., and Domínguez, R. (2000). *J. Endocrinol.* **166**, 205–211.
25. Potashnik, G., Insler, V., and Meizner, J. (1987). *Br. Med. J.* **294**, 219.
26. Hunter, R. H. F., Cook, B., and Baker, T. G. (1985). *J. Endocrinol.* **106**, 233–242.
27. Morse, A. M. and Van Wagenen, G. (1936). *Am. J. Obstet. Gynecol.* **32**, 823–832.
28. Morales, L., Chávez, R., Ayala, M. E., and Domínguez, R. (1998). *J. Endocrinol.* **158**, 213–219.
28. Aguado, L. I. and Ojeda, S. R. (1984). *Endocrinology* **114**, 1944–1946.
29. Albuquerque-Araujo, W. I. C., Rosa-E-Silva, A. A. M., Franci, J. A. A., Favaretto, A. L. V., and Antunes-Rodrigues, J. (1990). *Braz. J. Med. Biol. Res.* **23**, 1181–1184.
30. Lara, H. E., McDonald, J. K., Ahmed, C. E., and Ojeda, S. R. (1990). *Endocrinology* **127**, 2199–2209.
31. Cruz, M. E., Morán, J. L., Jaramillo, L. P., and Domínguez, R. (1990). *J. Endocrinol.* **124**, 37–41.