

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

---

**POSGRADO EN CIENCIAS  
BIOLÓGICAS**

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**PARTICIPACIÓN DEL NERVIO OVÁRICO  
SUPERIOR EN EL ANIMAL CON DENERVACIÓN  
SENSORIAL EN LA REGULACIÓN DE LAS  
FUNCIONES OVÁRICAS.**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGÍA EXPERIMENTAL**

**P R E S E N T A**

**JAVIER APOLONIO**

**DIRECTOR DE TESIS: DRA. LETICIA MORALES LEDESMA**

**MÉXICO, D.F.**

**MARZO, 2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



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

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

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

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

## AGRADECIMIENTOS

Al CONACyT por el financiamiento otorgado a través de la beca 172693 para la realización de mis estudios de Maestría en Ciencias. De igual modo, esta tesis fue elaborada con el apoyo del proyecto 30400/A1 de CONACyT.

A los miembros del comité tutorial por su guía y apoyo para la realización de esta tesis:

Dra. Patricia Rosas Saucedo.

Dra. Margarita Martínez Gómez.

Dra. Leticia Morales Ledesma.

Al Laboratorio de Hormonas Proteicas y al Laboratorio de Hormonas Esteroides del Departamento de Biología de la Reproducción del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición "Salvador Subirán", por las facilidades ofrecidas para la cuantificación de hormonas.

Al Dr. Roberto Chavira por su colaboración en la cuantificación de hormonas por radioinmunoanálisis.

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

## ÍNDICE

RESUMEN	I
I PUBERTAD EN LA RATA	1
II OVULACIÓN	4
III ASPECTOS GENERALES DE LA CAPSAICINA	7
IV INERVACIÓN OVÁRICA	11
Inervación simpática	12
Inervación sensorial	14
Las fibras nerviosas en la foliculogénesis	15
La inervación ovárica extrínseca en la modulación del desarrollo	17
Participación de la inervación extrínseca del ovario en la ovulación.	17
V EFECTOS DE LA DENERVACIÓN SOBRE LAS FUNCIONES OVÁRICAS	18
Denervación simpática	18
Denervación sensorial	20
VI PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	22
VII HIPÓTESIS	22
VIII OBJETIVO GENERAL	23
IX OBJETIVOS PARTICULARES	23
X MATERIALES Y MÉTODOS	24
Inyección de capsaicina	24
Sección del NOS	25
Operación simulada	25
Procedimiento de autopsia	25
Cuantificación de hormonas esteroides y gonadotrópicas	26
Análisis estadístico	26
XI RESULTADOS	
Sección del nervio ovárico superior a los 20 días.	27
Sección del nervio ovárico superior a los 28 días.	37
XII DISCUSIÓN	45
XIII CONCLUSIONES	51
XIV BIBLIOGRAFIA	52

## RESUMEN

Ha sido mostrado por varios autores el papel estimulador de la inervación simpática sobre las funciones ováricas. Sin embargo es poca la información con que se cuenta acerca de la participación de la inervación sensorial en estos procesos. En el presente estudio, analizamos si en la rata púber existe una relación funcional entre ambos tipos de innervación en la regulación del inicio de la pubertad, la ovulación espontánea y la respuesta esteroidogénica del ovario.

Para ello utilizamos como modelo experimental a la rata con denervación sensorial al nacimiento, inducida por la administración de capsaicina, sometida a la sección del nervio ovárico superior (unilateral o bilateral) al final de la etapa infantil o juvenil y sacrificada al primer estro vaginal.

Los resultados obtenidos muestran que la denervación sensorial o la simpática no modifican el inicio de la pubertad. En cambio en la rata con denervación sensorial y sección del nervio ovárico superior izquierdo o de ambos nervios, realizada a los 20 días de edad, se observó un retraso en la edad de la canalización vaginal. Cuando la sección del nervio ovárico se realizó en el animal de 28 días de edad no se observaron cambios en la edad de inicio de la pubertad.

En las hembras que fueron sometidas a la sección unilateral del nervio ovárico superior, se observó un efecto compensador en el número de ovocitos liberados por parte del ovario que conserva intacta su inervación. La respuesta compensadora dependió de la integridad de la inervación sensorial, ya que ésta no se presenta cuando se destruyen las fibras sensoriales desde el nacimiento.

La sección bilateral del nervio ovárico superior realizada a los 20 días de edad resultó en una menor concentración sérica de progesterona, comparada con el grupo con operación simulada ( $3.2 \pm 0.4$  vs.  $5.4 \pm 0.9$ ,  $p < 0.05$ ). Este efecto no se observó cuando la sección del nervio ovárico superior se realiza en ratas de 28 días de edad. La concentración de progesterona no se modificó cuando los animales fueron tratados con capsaicina al nacimiento.

La sección del nervio ovárico izquierdo a los 28 días de edad resultó en una disminución de la concentración sérica de estradiol, respecto al grupo con operación simulada ( $6.7 \pm 1.5$  vs.  $22.8 \pm 4.5$ ,  $p < 0.05$ ). Esta disminución desaparece cuando los animales fueron tratados previamente con la capsaicina. En las ratas de 20 días de edad, la sección bilateral del nervio ovárico resultó en una disminución significativa en la

concentración sérica de estradiol, respecto al grupo con operación simulada ( $6.7 \pm 0.5$  vs.  $12.0 \pm 1.7$ ,  $p < 0.05$ ). Esta disminución permaneció aún cuando se eliminaron las fibras sensoriales al nacimiento.

Cuando la sección bilateral se realizó a los 20 días de edad, la concentración de progesterona y estradiol fue significativamente menor que el grupo testigo. Este efecto desapareció en las hembras con denervación sensorial.

La eliminación de las fibras simpáticas no modificó la concentración sérica de las gonadotropinas. En la hembra sometida a la denervación sensorial al nacimiento, la sección bilateral del nervio ovárico a los 20 días de edad, disminuyó la concentración de la LH ( $1.0 \pm 0.1$  vs.  $2.2 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$ ).

Con base en los resultados obtenidos en este estudio, proponemos que el principal componente en la modulación de la función ovárica es la información que transportan las fibras simpáticas y apoyamos nuestra hipótesis de que a nivel del ovario, existe una relación bidireccional entre la información que transcurre por las fibras simpáticas y las sensoriales, éstas últimas sensibles a la capsaicina. Donde además, la participación de la inervación depende de la edad del animal en estudio.

## I. PUBERTAD EN LA RATA

La pubertad es considerada como una fase de transición de inmadurez hacia la etapa adulta y es en este momento cuando se producen los primeros gametos maduros y se inicia la actividad reproductiva (Ojeda y Urbanski, 1994).

El inicio de la pubertad implica una serie de cambios neuroendocrinos a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, que van a culminar con la maduración sexual y el inicio de la capacidad reproductiva. En la rata hembra, el indicio externo de que la pubertad ha iniciado es la apertura vaginal, como resultado de la estimulación estrogénica. La apertura de la vagina ocurre entre los días 35 a 40 de vida, un día después de que se presenta la elevación brusca en las concentraciones plasmáticas de las gonadotropinas, a este aumento se le conoce como el primer "pico" preovulatorio de gonadotropinas. Además de los cambios anatómicos, se presentan una serie de variaciones a nivel hormonal, que van a facilitar la canalización de la vagina y el establecimiento de los ciclos estrales. Normalmente, el primer frotis vaginal presenta células cornificadas, características de la etapa del estro (Ojeda y Urbanski, 1994), aunque en algunas cepas de rata, el primer frotis corresponde a un diestro y es alrededor de las 48 horas posteriores que se presenta el estro vaginal y la primera ovulación (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990).

Las etapas previas a la pubertad están caracterizadas por cambios neuroendócrinos, además de un rápido aumento de peso y talla corporal. Con base en parámetros morfofisiológicos del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, Ojeda y col. (1980) proponen clasificar este periodo en cuatro fases o etapas:

**Etapa neonatal:** Se extiende desde el nacimiento hasta el séptimo día de vida. En la rata se da la diferenciación sexual del encéfalo durante el nacimiento, inducida por la presencia o ausencia de testosterona testicular. En esta etapa ocurre en el ovario el inicio de la foliculogénesis, el cual es independiente de las gonadotropinas, debido a que los primeros folículos primordiales que pueden observarse 24 horas después del nacimiento, no presentan receptores a la hormona estimulante del folículo (FSH) o a la hormona luteinizante (LH) sino hasta el día cuatro o cinco de vida de la rata (Malamed y col., 1992).

Poco después del nacimiento, las concentraciones plasmáticas de FSH comienzan a incrementarse, y llegan a sus concentraciones máximas hacia el día 12 de vida, para posteriormente disminuir hacia el final de la etapa juvenil. En cuanto a la LH, también se observa un incremento en esta etapa, pero menos evidente que para la FSH (Ojeda y Urbanski, 1994).

En el quinto día de vida la síntesis de estradiol, a partir de testosterona, es estimulada por la FSH. En el torrente sanguíneo se encuentra en grandes cantidades la  $\alpha$ -feto proteína, la cual se une a los estrógenos, por lo que no puede establecerse aún el efecto inhibitorio para regular la secreción de gonadotropinas (Raynaud, 1973, en Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990). Al finalizar la etapa infantil el ovario es capaz de responder a las gonadotropinas circulantes y por ende se da una mayor actividad esteroidogénica. Las concentraciones de FSH aumentan y las de la LH se mantienen bajas (Ojeda y Urbanski, 1994).

**Etapa infantil:** Se presenta del día 8 al 21 de vida. Las concentraciones plasmáticas de FSH que se observan durante esta etapa son decisivas para el reclutamiento y estimulación del crecimiento de los folículos, mientras que la concentración de LH disminuye. En esta etapa comienzan a presentarse “picos” esporádicos de LH. Al parecer, los picos esporádicos de LH en la etapa infantil tienen su origen en la activación de neuronas noradrenérgicas en el área preóptica (POA). Durante la etapa infantil, la producción ovárica de estrógenos, a partir de precursores, se incrementa considerablemente y la FSH es capaz de inducir actividad de la enzima aromatasa (Ojeda y Urbanski, 1994).

Las concentraciones de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) comienzan a incrementarse significativamente después del nacimiento y hasta el final del desarrollo juvenil. En esta etapa del desarrollo ya puede observarse que la liberación de la GnRH se da de manera pulsátil, y se ha propuesto que el incremento observado en las concentraciones de FSH hasta antes del día 12 postnatal, se puede deber a una baja frecuencia de los pulsos de la GnRH, a una respuesta diferencial por parte de la hipófisis, debida a una mayor cantidad de gonadotropos en esta etapa o bien a que los estrógenos aún no son capaces de actuar en el hipotálamo, ya que se ha planteado que desde el quinto día de vida se sintetizan estrógenos a partir de testosterona por la estimulación de FSH, pero que estos no pueden actuar en el control de gonadotropinas por la presencia de la  $\alpha$ -fetoproteína (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Después del día 15 de vida disminuyen las concentraciones plasmáticas de FSH y desaparecen los “picos” espontáneos de LH y a partir de este momento, se hace más eficiente la retroalimentación negativa por parte del estradiol en la secreción de las gonadotropinas, ya que la  $\alpha$ -feto proteína disminuye (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Greenstein, 1992).

**Etapa juvenil** (del día 22 al 32 de vida): Al inicio de esta etapa la concentración de LH llega a su nivel más bajo, pero tiende a aumentar y su secreción se da en forma pulsátil a intervalos de 30 minutos. Hacia el final de esta etapa, se establece un ritmo de secreción circadiano de la LH, ya que sus concentraciones y la amplitud de sus pulsos aumentan diariamente durante la tarde. Las bajas concentraciones de gonadotropinas plasmáticas en la etapa juvenil, enmascaran la verdadera actividad hipotalámica debido a la baja afinidad hacia la GnRH por parte de la hipófisis. Es en esta etapa que maduran las neuronas generadoras de pulsos de GnRH, es cuando puede presentarse el efecto de retroalimentación positiva del estradiol sobre la unidad hipotálamo-hipófisis. En tanto que en el ovario se da una mayor esteroidogénesis, bajo la influencia de la LH y el aumento de la cantidad de receptores a la misma. En cambio, las concentraciones plasmáticas de FSH permanecen bajas. Al final de esta etapa el contenido de receptores a FSH en el ovario alcanzarán un máximo (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994).

Durante la etapa juvenil el crecimiento del ovario es influenciado por las bajas concentraciones séricas de LH y FSH, durante esta etapa los ovarios presentan ondas de desarrollo y atresia folicular. Pero al parecer, existen varios factores, además de las gonadotropinas, que regulan la maduración del ovario (Ojeda y Urbansky, 1994).

**Etapa peripuberal:** Se lleva a cabo después del día 33 hasta la primera ovulación. Hacia la cuarta semana de vida se observa un cambio en la liberación diurna de la LH, lo que se ha utilizado como un indicador de que el animal se aproxima a la pubertad. En la quinta semana de vida las concentraciones basales de LH y la amplitud de los pulsos son mayores durante la tarde, y el patrón circadiano de la LH se hace bien definido. La secreción de prolactina es semejante a la de LH, concentración baja durante la mañana con "picos" vespertinos cada día (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994). Se ha reportado que en algunos animales se presentan episodios sostenidos en liberación de LH a media tarde, llamados "micropicos", los cuales podrían ser importantes para la activación peripuberal de la función ovárica. Se ha propuesto que la maduración del ovario es influenciada por un cambio en la actividad biológica de las gonadotropinas circulantes, ya que se ha observado que hacia el final de la etapa peripuberal la bioactividad de la FSH se incrementa y en cuanto a la LH parece encontrarse en diferentes formas moleculares, que al parecer presentan la misma actividad biológica. Los receptores a LH incrementan significativamente en número entre las fases de anestro y proestro tardío (Ojeda y Urbanski, 1994). En esta etapa, se

presenta la máxima respuesta esteroidogénica del ovario, ya que durante este periodo existe el mayor número de receptores a FSH y LH, lo que resulta en un aumento de las concentraciones de estradiol, progesterona y testosterona. El establecimiento del patrón de liberación circadiano de LH desencadena una serie de eventos, como es el incremento en estrógenos y progesterona, incremento que actúa sobre el hipotálamo, el cual secreta la GnRH, con el consecuente pico preovulatorio de FSH y LH que culmina con el primer estro y la primera ovulación (Becu-Villalobos y Lacau-Mengido, 1990; Ojeda y Urbanski, 1994). Ojeda y Urbanski (1994) proponen que de acuerdo a criterios morfológicos el inicio de la pubertad en la rata puede dividirse en varios pasos:

**Anestro:** Corresponde a la fase donde el cambio en la forma de liberación de LH comienza a ocurrir. Inicia aproximadamente a los 30 días de edad, el útero es pequeño y sin fluido interno.

**Proestro temprano:** Aquí las ratas presentan útero grande con fluido intraluminal, la vagina permanece cerrada.

**Proestro tardío:** Esta fase corresponde al primer proestro. El útero se presenta "balonado" debido a la cantidad de fluido que contiene en su interior. Los ovarios presentan folículos preovulatorios. La mayoría de animales en esta fase muestran cerrada la vagina.

**Estro:** Es el día en que se presenta la primera ovulación. Ya no hay líquido intrauterino, los cuerpos lúteos pueden ser fácilmente distinguidos, la vagina se canaliza y los frotis vaginales presentan predominantemente células cornificadas.

**Primer diestro:** Esta fase de la pubertad se caracteriza por una citología vaginal con predominancia de leucocitos así como la presencia de cuerpos lúteos maduros en el ovario.

## II. OVULACIÓN

El ovario cumple con dos funciones importantes para el organismo, una de ellas es la producción de hormonas esteroides, la otra es la producción y la posterior liberación de óvulos fértiles. La ovulación es un proceso complejo que consiste en un rápido incremento del volumen folicular, durante el cual los ovocitos, las células de la granulosa y las de la teca adquieren características funcionales específicas (Espey, 1999; Richards y col., 2002), seguido por la protrusión del folículo preovulatorio desde la corteza ovárica y

culmina con la extrusión del ovocito que va acompañado por las células del cúmulo (Yen y Adashi, 2001).

Las hormonas gonadotrópicas estimulan la maduración de los folículos ováricos dominantes y culmina con la expulsión de los óvulos hacia el oviducto, evento conocido como ovulación. En la superficie del folículo preovulatorio se presenta un estigma cónico, al darse la ruptura de éste, ocurre la expulsión lenta del ovocito y del líquido antral. La formación del estigma y la ruptura de éste se dan por la acción de enzimas proteolíticas activas, una de ellas la plasmina que es activada por el activador del plasminógeno, que actúan sobre los sustratos proteicos de la membrana basal. Se ha observado que la producción de activadores de plasminógeno por las células de la granulosa es dependiente de la FSH (Espey, 1999; Yen y Adashi, 2001).

En los mamíferos la ovulación es un fenómeno similar a una respuesta inflamatoria, ya que se ha observado incremento en la cantidad de leucocitos, de una forma similar a cuando se produce una reacción inflamatoria aguda. Además se ha reportado que las citocinas, el factor activador de plaquetas, los factores de crecimiento y las metaproteasas pueden participar en la respuesta inflamatoria que se produce durante la ovulación (Espey, 1999; Yen y Adashi, 2001). Por otra parte, se sabe que es posible inhibir la ovulación al aplicar un agente antiinflamatorio como la indometacina (Espey, 1999) o bien por la administración sistémica o intrabursal de dimetilditiocarbamato de sodio (Goldman y col., 1997).

A medida que el ápice de un folículo maduro se expande, la pared folicular se hace cada vez más delgada hasta ser translúcida, es en este lugar donde se forma un estigma. Si por alguna razón el aporte vascular disminuye, el estigma no se forma. Cabe aclarar que no en todos los mamíferos se presenta esta estructura. La extrusión del cúmulo-ovocito depende de factores tales como una adecuada degradación del tejido conectivo de la pared folicular, la presión intrafolicular (Espey, 1999; Yen y Adashi, 2001), así como del músculo liso asociado a la pared folicular (Greenwald y Roy, 1994). El factor de crecimiento neural (NGF) podría estar participando en la degradación del tejido conectivo del folículo, además de colaborar en la diferenciación de las células de la teca, posterior a la ruptura de la pared folicular (Ojeda, 1997).

Durante el incremento de volumen del folículo, previo a la ruptura folicular, el cúmulo se internaliza hacia el centro del antro folicular, posiblemente esto facilite el desalojo y expulsión del cúmulo al momento de la ovulación. Además podría ser importante para

evitar que el ovocito sea dañado por la actividad proteolítica que ocurren en la pared folicular y capas tecales durante la ovulación (Espey, 1999).

En la región apical del folículo preovulatorio, donde ocurre la ruptura, están presentes cinco capas diferentes de células. La cubierta más externa es el epitelio superficial, conformado por células epiteliales cuboidales, con un grosor de una sola célula. La segunda capa es la túnica albugínea, que está compuesta de fibroblastos y colágeno, esta capa está fuertemente adherida y rodea al ovario por completo. La tercera capa es la teca externa, formada por tejido conectivo, delimita la periferia del folículo. La cuarta capa está formada por las células secretoras de la teca interna, cuyo borde interior está delimitado por una lámina basal llamada membrana propia. La capa más interna es el estrato granuloso (Espey, 1999; Yen y Adashi, 2001).

Al parecer, el epitelio superficial no participa en la ovulación; su función podría ser la de representar la primera línea de defensa en la protección de los diferentes componentes ováricos. Poco antes de la ruptura, las células del epitelio superficial desarrollan numerosas vacuolas en su citoplasma y adquieren un aspecto necrótico, estas células son desechadas y al momento de la ruptura ya no están presentes en el área del estigma. Poco antes de la ruptura, se pueden observar cambios estructurales en la túnica albugínea y en la teca externa. Los fibroblastos que las componen comienzan a proyectar procesos citoplasmáticos a partir de su masa central y se transforman, de células quiescentes a fibroblastos proliferativos. Posteriormente, estas células activadas adquieren movilidad y comienzan a desplazarse dentro del área del folículo. Cuando esto ocurre, el tejido en el área apical del folículo comienza a separarse por efecto de la presión intrafolicular (Espey, 1999).

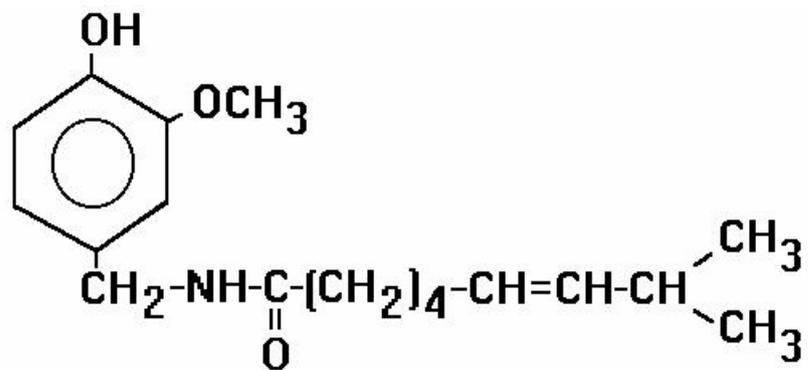
En la teca interna, los cambios visibles durante la ovulación están relacionados con la amplia red de capilares presente en esta capa. Los folículos preovulatorios se tornan color rojo al incrementarse el flujo sanguíneo hasta en cinco veces su volumen normal y se incrementa la permeabilidad capilar, por lo que algunos folículos pueden presentar sangrado o puntos rojos en sus paredes. La hiperemia folicular es el resultado de la acción de la histamina y la prostaglandina E<sub>2</sub>, ambos agentes provocan la relajación del músculo liso vascular (Espey, 1999; Yen y Adashi, 2001).

Por otra parte, se presenta un incremento en la cantidad de leucocitos polimorfonucleares que arriban al folículo, pero los macrófagos u otras células derivadas de los leucocitos son raros en el compartimiento tecal previo a la ruptura. Se ha asociado la presencia de leucocitos con la actividad proteolítica que degrada el tejido conectivo

durante la ruptura, pero su presencia podría estar más relacionada con la presencia de agentes leucotácticos comunes en un proceso inflamatorio (Espey, 1999). En cuanto a las células de la granulosa, es posible observar que poco antes de la ruptura se encuentran menos unidas entre sí y que las células más internas comienzan a dispersarse en el líquido folicular. Además de ser muy activas en la secreción de hormonas esteroides, las células de la granulosa no presentan otros cambios apreciables antes de la ruptura. La síntesis de progesterona se incrementa poco después de que ha comenzado el proceso ovulatorio, en tanto que los andrógenos y estrógenos ováricos disminuyen (Espey, 1999; Richards y col., 2002).

### III. ASPECTOS GENERALES DE LA CAPSAICINA

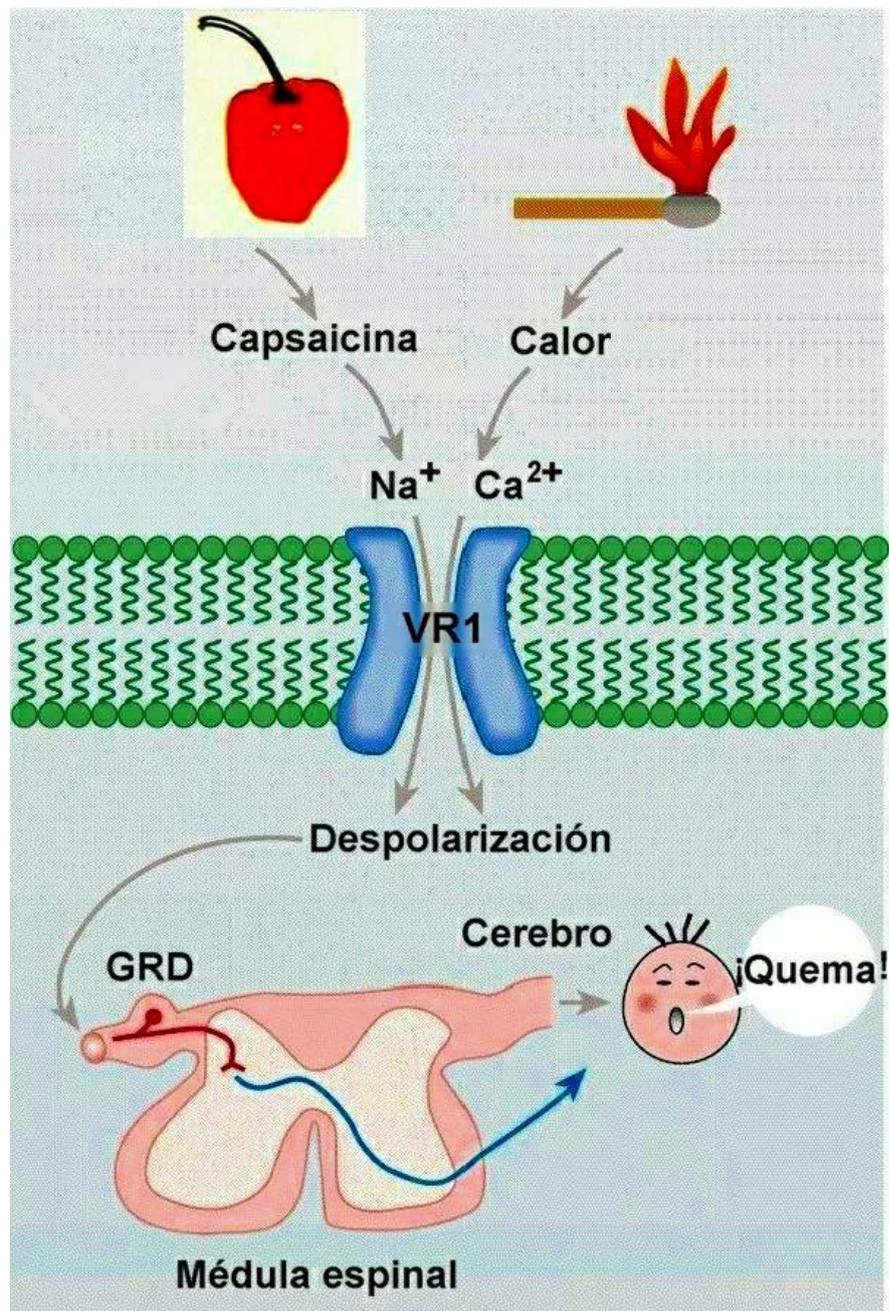
La capsaicina es el principal agente picante de los chiles del género *Capsicum*. Pertenece al grupo químico de los vanilloides, su nombre químico es 8-metil-N-vainillil-6-nonenamida (Fig. 1). Actualmente se conocen sus efectos neurotóxicos sobre neuronas sensoriales primarias de mamíferos (Holzer, 1991).



**Figura 1.** Estructura química de la capsaicina (Tomado de Burks y col., 1985).

El efecto irritante y picante de los chiles es traducido por neuronas periféricas sensoriales que tienen su soma en el ganglio de la raíz dorsal (GRD). En las fibras sensoriales la capsaicina provoca inicialmente despolarización de la membrana neural lo que induce excitación, posteriormente inhibe la repolarización de la membrana, lo que ocasiona pérdida de la sensibilidad, ya que la fibra nerviosa no puede ser excitada nuevamente (Fig. 2) (Burcks y col., 1985; Caterina y col., 1997), en tanto que la aplicación reiterada de la neurotoxina produce insensibilidad de la fibra nerviosa a diversos estímulos

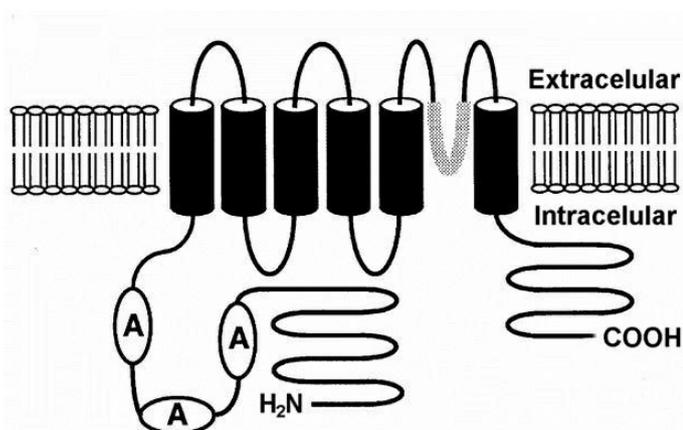
fisicoquímicos nocivos, incluso la fibra se torna insensible a la capsaicina misma (Holzer, 1991).



**Figura 2.** Esquema representativo de la acción de la capsaicina sobre las fibras sensoriales y ruta del estímulo nervioso (Modificado de Clapham, 1997) (GRD: ganglio de la raíz dorsal).

La capsaicina actúa específicamente sobre un subgrupo de neuronas aferentes primarias, conocidas como nociceptores: fibras tipo A $\delta$  y C, que son sensibles a estímulos nocivos químicos, térmicos y mecánicos (Holzer, 1991; Szallasi y Blumberg, 1996). Las fibras sensoriales primarias de diámetro grueso (A $\alpha$  y A $\beta$ ) no participan en la transmisión de estímulos sensoriales nocivos y por tanto no son sensibles a la capsaicina. Las fibras A $\delta$  regulan el denominado dolor rápido-agudo y las fibras C el dolor que es más difuso y retrazado producido por estímulos nocivos. Tanto las fibras de tipo A $\delta$  como las de tipo C (Julius y Basbaum, 2001) y las de tipo B (Szoke y col, 2002) pueden ser afectadas por la capsaicina. En contraste, las fibras A $\alpha\beta$  que responden al tacto no nocivo, a la vibración y al frío no son afectadas por el tratamiento con capsaicina (Burks y col., 1985).

Las fibras sensoriales C y A $\delta$  sensibles a la capsaicina poseen un receptor proteínico transmembranal conocido como VR-1 (Vanilloid Receptor type 1) (Caterina y col., 1997), pero se ha propuesto que podrían ser dos los receptores a vanilloides (Szallasi y Blumberg, 1996, Cook col., 1997). El receptor VR-1 también se puede encontrar en tejido no neural, tal es el caso del músculo liso, epitelio de la vejiga urinaria, y queratinocitos epidermales (Di Marzo y col., 2002). El VR-1 es un canal de cationes no selectivo que consta de seis segmentos transmembrales, un asa que define el poro acuoso conductor de iones entre los segmentos 5 y 6, y extremos C y N intracelulares (Fig. 3). Este receptor presenta similitudes con la familia de canales de calcio TRP, propuestos como mediadores de la entrada del calcio extracelular a las células después de la depleción de las reservas intracelulares del mismo (Caterina y col., 1997; Krees y Zeilhofer, 1999).



**Figura 3.** Modelo propuesto para la estructura del receptor a vanilloides VR-1 (Modificado de Krees y Zeilhofer, 1999).

Se desconoce el sitio de unión de la capsaicina al receptor, pero se ha propuesto que puede actuar tanto intra o extracelularmente (Caterina, y col., 1997; Krees y Zeilhofer, 1999; Gasque y Félix, 2000). La activación del VR-1 puede ser modulada por varios factores, entre ellos el pH y la temperatura. En medios de cultivo, donde se produce incremento de protones se da como respuesta la activación del receptor VR-1 (Caterina y col., 1999), esta respuesta es semejante a cuando se presenta un calor nocivo, por arriba de los 43 °C, (Fig. 2) (Julius y Basbaum, 2001).

Existen dos tipos de fibras A $\delta$  (tipo I y II) que responden a estímulos mecánicos intensos, pero presentan una respuesta diferencial al calor intenso o daño al tejido. Las fibras A $\delta$  tipo II presentan al receptor VR-1, que tiene afinidad por la capsaicina y se activa a 43°C. Las de tipo I presentan el receptor homólogo a VR-1, VRL-1, que se activa a 53°C y no se une a la capsaicina (Nagy y Rang, 1999; Kirschstein y col., 1999).

Por su parte, los nociceptores C son en su mayoría polimodales y responden a estímulos térmicos y mecánicos nocivos. Algunos sólo responden al calor intenso. La mayoría de las fibras C además responden a estímulos químicos nocivos tales como los producidos por ácido o capsaicina (Julius y Basbaum, 2001). De forma similar a las fibras A $\delta$ , se ha encontrado que existen dos subgrupos de fibras C, un grupo al que se le conoce como peptidérgico, el cual contiene como neurotransmisor a la sustancia P (SP) y expresa al TrkA, que es un receptor de alta afinidad para el NGF, estas fibras son sensibles a la capsaicina (Schmidt y col., 1995; Snider y McMahon, 1998). El segundo grupo de fibras C no expresa los elementos anteriores, sino que son marcados selectivamente por el ligando  $\alpha$ -D-galactosil lectina IB<sub>4</sub>, y expresa receptores P2X<sub>3</sub>, un subtipo de receptor asociado con canales iónicos, estas fibras no son afectadas por la capsaicina (Julius y Basbaum, 2001). Aproximadamente el 45% de las fibras de diámetro pequeño a medio (A $\delta$  y C) son activadas a temperaturas cercanas a los 45°C, mientras que un 5-10% de las fibras responde a temperaturas de 52°C y son insensibles a la capsaicina (Nagy y Rang, 1999; Kirschstein y col., 1999).

### **Mecanismo de acción del agente neurotóxico**

Existen diferentes hipótesis acerca de la forma como actúa la capsaicina. Una de estas plantea que el efecto neurotóxico de la capsaicina se manifiesta en un deterioro de la capacidad de las fibras nerviosas aferentes para realizar el transporte retrógrado de factores neurotróficos, esenciales para mantener la síntesis de SP en la fibra sensorial. Se ha sugerido que el factor neurotrófico específico es parecido al NGF, que es esencial para

la sobrevivencia y proliferación de las fibras nerviosas. Al verse inhibido el transporte retrógrado del NGF, el factor no puede llegar a los somas de las células nerviosas, lo que ocasiona una disminución en la tasa de incorporación de prolina durante la síntesis de SP, esto se traduce en una menor producción del neurotransmisor y al final es depletado completamente (Burcks y col., 1985).

Por su parte, Caterina y col. (1997), proponen que el efecto neurotóxico se origina cuando la capsaicina interactúa con componentes de membrana cerca de las terminales de las fibras aferentes primarias, formándose enlaces covalentes, lo cual incrementa la permeabilidad de la membrana a iones calcio y sodio (Fig. 2). Es posible que la alteración producida por la capsaicina en la membrana este relacionada con la activación del receptor específico VR-1 o a la interacción de las moléculas hidrofóbicas del vanilloide con la bicapa lipídica. La muerte de fibras nerviosas expuestas a la capsaicina estaría relacionada con el ingreso excesivo de iones, principalmente calcio, que provocan toxicidad.

La capsaicina también puede provocar la muerte de las fibras nerviosas sensoriales por apoptosis, ya que células que expresan el VR-1 presentan fragmentación del ADN, rasgo característico de la apoptosis, además de que las mitocondrias presentes en la fibra presentan alteraciones a nivel de su potencial de membrana (Shin y col. 2003). El incremento excesivo del  $Ca^{2+}$  intracelular, después de la unión de la capsaicina al VR-1, sería la causa de la necrosis y la apoptosis celular de las fibras aferentes primarias, ya que se ha sugerido que provoca disfunción de la membrana plasmática de las mitocondrias, que ocasiona que se abran poros de transición de permeabilidad mitocondrial (MPT) (Duchen, 2000). Esta apertura lleva a la pérdida de componentes de la matriz celular, disfunción e hinchazón de la mitocondria, con la consecuente ruptura de la membrana externa y liberación al citosol o al núcleo de factores inductores de la apoptosis, tales como el citocromo *c*, el cual activa a las caspasas y endonucleasas, dando como resultado la posterior muerte de la fibra (Green y Reed, 1998; Szoke y col., 2002).

#### **IV. INERVACIÓN OVÁRICA**

Es bien conocido el papel regulador que ejercen las gonadotropinas sobre el desarrollo folicular y la actividad secretora del ovario, pero no son los únicos componentes que pueden modular la función gonadal, ya que además existe una regulación neural directa (Gerendai y Halász, 1997; Gerendai y col., 2000; Morales y col., 1993, 2004). En

apoyo a esto, se ha postulado una vía neural aferente-eferente entre las gónadas y el SNC. Las fibras nerviosas llegan a la mayoría de los componentes del ovario, incluyendo el tejido intersticial y los folículos en desarrollo, si bien llegan a la teca externa e interna no alcanzan a las células de la granulosa ni al cuerpo lúteo (Dissen y Ojeda, 1999; Gerendai y Halász, 1997).

En los ovarios la regulación del flujo sanguíneo, el control de la esteroidogénesis y el desarrollo folicular son modulados por la información aportada por la inervación aferente-eferente entre la gónada y el SNC (Lara y col., 1990a y b), por una fuente intrínseca de catecolaminas (Ben-Jonathan y col., 1984) y péptidos de la familia de factores de crecimiento de las neurotrofinas (Dissen y col., 1996, 2001 y 2002; ; Mayerhofer y col., 1996 y 1997; Romero y col., 2002).

### **Inervación simpática**

El ovario de la rata recibe en mayor proporción fibras de naturaleza simpática y en menor grado fibras parasimpáticas. La inervación simpática esta compuesta por fibras de naturaleza catecolaminérgica y peptidérgica. Las fibras simpáticas que contienen noradrenalina (NA) llegan al ovario por dos vías: el nervio ovárico superior (NOS), el cual está asociado con el ligamento suspensorio (que sujeta al ovario, oviducto y útero a la cavidad peritoneal) y por el plexo ovárico (PO), el cual transita a lo largo de la arteria ovárica, mientras que las que contienen el péptido intestinal vasoactivo (VIP, por sus siglas en inglés) lo hacen sólo por el NOS y las que contienen neuropéptido Y (NPY) viajan por el PO (Dissen y Ojeda, 1999, Lawrence y Burden, 1980).

Las fibras simpáticas que llegan al ovario vía PO inervan principalmente la vasculatura ovárica, mientras que las que llegan por el NOS inervan las células intersticiales y de la teca (Dissen y Ojeda, 1999).

En el ovario existen fibras de naturaleza simpático-sensorial, en las cuales coexisten como neurotransmisores el VIP y el polipéptido activador de la adenilato ciclasa hipofisiaria (PACAP, por sus siglas en inglés) (Dissen y Ojeda, 1999).

Las neuronas preganglionares simpáticas se agrupan en la columna intermediolateral de la médula espinal, en la región que va del primer segmento dorsal hasta los segmentos lumbares rostrales. Posteriormente, salen de la médula a través del asta anterior, a partir de ahí se separan de las fibras motoras y continúan en forma de haces (ramas comunicantes) hacia los ganglios de la cadena simpática paravertebral (Iversen y col., 2001). La porción simpática de la inervación ovárica proviene de los

segmentos T11 a L4 de la cadena simpática y hacen sinapsis en los ganglios celiaco y mesentérico superior, además de los nervios espláncnicos lumbares (Dissen y Ojeda, 1999).

Las fibras preganglionares simpáticas son en su mayoría mielinizadas, de diámetro pequeño y velocidad de conducción relativamente lenta. Cada fibra preganglionar forma sinapsis con varias neuronas posganglionares, en una proporción de 1:10. En tanto que las fibras posganglionares en su mayoría son amielínicas y salen de los ganglios a través de las ramas comunicantes grises (Dissen y Ojeda, 1999; Iversen y col., 2001).

Se ha reportado la presencia de neuronas intrínsecas en el interior de los ovarios de varias especies de mamíferos, entre los cuales se encuentran el ser humano (Anesetti y col., 2001), el mono rhesus (*Macaca mulata*) (Dees y col., 1995) y la rata (D'Albora y col., 2000, 2002). Algunas fibras encontradas en el interior del ovario de los primates son de naturaleza catecolaminérgica (Dees y col., 1995).

En el ovario de la rata se ha identificado un componente neural intrínseco, en forma de ganglios bien desarrollados localizados en el mesoovario y el hilio. También se han observado neuronas en la corteza y la médula pero de una forma dispersa, aunque se pueden presentar algunos ganglios. En los ganglios mesoováricos, los cuerpos neurales son esféricos, forman agregados estrechos y paquetes de fibras nerviosas. Los ganglios mesováricos presentan cuerpos neuronales multipolares. Al parecer, fibras de estos ganglios envían fibras que se incorporan a las ramas del plexo ovárico. En el hilio y la médula, se pueden observar ganglios bien definidos parecidos a cadenas, asociados a vasos sanguíneos que corren a lo largo del tejido conectivo. Los ganglios que se encuentran en la corteza presentan células redondeadas, pequeñas, con pocas dendritas, con arreglo polar y algunas veces, neuronas de forma irregular. También pueden observarse algunas neuronas en el tejido intersticial que rodea a los folículos (D'Albora y col., 2000; 2002).

La presencia de neuronas en el ovario de la rata parece depender de la cepa, ya que se han identificado neuronas en el ovario de ratas de la cepa Wistar, pero no se detectaron en ovarios de ratas Sprague-Dawley o Long-Evans. También la edad determina la presencia de neuronas ováricas intrínsecas, ya que conforme avanza la edad, el número de neuronas disminuye. Se ha planteado que el desarrollo de las neuronas intrínsecas ováricas podría obedecer a cambios morfológicos y funcionales asociados con el crecimiento folicular que se dan durante el desarrollo sexual de la rata y podría reflejar una relación trófica dinámica entre las neuronas y los blancos que inervan.

Además, se ha reportado que en la rata algunas de las neuronas ováricas son de naturaleza catecolaminérgica y por tanto podrían estimular la esteroidogénesis conjuntamente con la innervación simpática extrínseca (D'Albora y col., 2000; 2002).

### **Inervación sensorial**

Las fibras sensoriales contienen como neurotransmisores principales a la SP y al péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP). Las fibras sensoriales arriban al ovario mediante el PO y el nervio vago. Se ha reportado que tanto SP como CGRP pueden coexistir en una misma fibra nerviosa sensorial, así mismo, se ha encontrado que también pueden presentar VIP y PACAP (Calka y col., 1988; Dissen y Ojeda, 1999; Gerendai y col., 2000).

Las fibras sensoriales que inervan al tracto reproductor se agrupan en la columna intermediolateral de la médula espinal. Posteriormente, salen de la médula a través del asta posterior hacia el ganglio de la raíz dorsal en los segmentos torácicos T9-T11 y craneolumbares L2-L4; el resto de fibras sensoriales que llegan al ovario es aportado por el ganglio nodoso del nervio vago (Dissen y Ojeda, 1999; Gerendai y Halász, 1997). Las fibras sensoriales pueden clasificarse de acuerdo a criterios morfológicos y fisiológicos en tres grupos principales: 1) fibras gruesas mielinizadas (fibras  $A\alpha$  y  $A\beta$ ), que presentan citoplasma claro y un retículo endoplásmico bien desarrollado, además presentan altas velocidades de conducción de información mecánica nociceptiva de la piel y el músculo. 2) Fibras delgadas amielínicas, que tienen una velocidad de conducción más baja (fibras C), y son principalmente nociceptores polimodales o quimionociceptores. Estas fibras responden a estímulos nocivos mecánicos, térmicos y químicos. 3) Fibras cortas mielinizadas, que conducen a velocidades intermedias (fibras  $A\delta$ ) y que llevan estímulos nociceptores polimodales y mecanonociceptores, así como información nonociceptiva (mecanorreceptores y receptores de frío) (Fig.4) (Holzer, 1991; Julius y Basbaum, 2001; Szoke y col., 2002). Existe otro grupo de fibras sensoriales clasificadas como fibras tipo B, que presentan un citoplasma densamente teñido, normalmente son más grandes que las fibras tipo A, presentan pocos neurofilamentos pero muchos ribosomas libres y láminas de retículo endoplásmico cortas y dispersas, así como un aparato de Golgi bien desarrollado (Szoke y col., 2002).



**Figura 4.** Diferentes tipos de fibras sensoriales aferentes (modificado de Julius y Basbaum, 2001).

Recientemente se ha planteado que la inervación sensorial llega a casi todos los compartimentos ováricos, pero principalmente se ha encontrado en la vasculatura. A la SP y al CGRP se les asocia con la regulación del flujo sanguíneo y con la aportación de una vía sensorial aferente a partir del ovario. Además, al CGRP se le asocia con un efecto vasodilatador potente. Se piensa que la información transmitida al SNC por la inervación sensorial consistiría de “sensaciones” del estado individual del desarrollo folicular (Calka y col., 1988; Dissen y Ojeda, 1999).

Resultados previos de nuestro laboratorio nos permiten sugerir que la participación de la inervación sensorial en la regulación de la actividad ovárica más que directa, es mediante la modulación fina de la actividad de las fibras simpáticas (Morán y col, 2003).

#### **Participación de la inervación en la foliculogénesis**

En el ovario de la rata recién nacida los folículos carecen de receptores a gonadotropinas y estos empiezan a sintetizarse al finalizar la primera semana de vida. Sin embargo, se ha reportado la presencia de fibras de naturaleza catecolaminérgica en el

ovario de la rata de 19 de vida prenatal (Malamed y col., 1992), razón por la cual se ha propuesto que el inicio de la foliculogénesis es mediado por la inervación aferente del ovario. Además se ha encontrado que los mecanismos intracelulares que regulan las acciones de las gonadotropinas en sus células blanco son funcionales antes de que la gónada adquiera la capacidad de responder a la LH o FSH (Sokka y Huhtaniemi, 1990; Mayerhofer y col., 1997).

En el ovario de la rata se observa la presencia de fibras nerviosas antes de que se produzca la foliculogénesis. La mayor parte de estas fibras se concentran en la médula. Malamed y col. (1992) mostraron que en el ovario de fetos de rata de 19 días de gestación o recién nacidas (no más de 15 horas después del nacimiento), existen fibras que son inmunorreactivas a la tirosina hidroxilasa (enzima que limita la tasa de síntesis de catecolaminas), por lo que se sugiere que las fibras que participan en el inicio del desarrollo folicular son de naturaleza catecolaminérgica. Estas evidencias han permitido postular que existe una relación estrecha entre la presencia de las fibras nerviosas y el inicio de la foliculogénesis (Dissen y Ojeda, 1999).

Las evidencias experimentales llevan a pensar que la presencia de los neurotransmisores desde antes de la foliculogénesis es fundamental para “preparar” al ovario para la síntesis de los receptores a las gonadotropinas (Mayerhofer y col., 1997).

El mecanismo por medio del cual los neurotransmisores ejercerían su efecto podría ser mediante las uniones gap, que comunican los diferentes compartimientos ováricos (Malamed y col., 1992). Pero no solamente los neurotransmisores podrían modular la foliculogénesis, también se encuentran los factores de crecimiento, que podrían actuar mediante la activación de mecanismos dependientes del AMPc (Romero y col., 2002). Al respecto, se ha observado que en ratones que no pueden sintetizar NGF (debido a que presentan una mutación en el gen que codifica para este factor), la formación de folículos ováricos puede ser inhibida, lo que podría indicar que este factor de crecimiento participa en la foliculogénesis (Ojeda, 1997; Romero y col., 2002). Por lo anterior, se ha propuesto que, al menos en parte, la formación inicial de folículos ováricos es facilitada por información de origen neural (Malamed y col., 1992, Mayerhofer y col., 1997).

Tradicionalmente a la inervación sensorial se le asocia con la regulación del flujo sanguíneo ovárico. Las fibras que contienen NPY y que se agrupan principalmente en la vasculatura de la gónada participan en la modulación del tono vascular, en la regulación del flujo sanguíneo ovárico y en la conducción de la información sensorial procedente del ovario (Dissen y Ojeda, 1999). Pero recientemente se ha considerado que las fibras

sensoriales no son sólo una vía de aferencias sensoriales desde el ovario al SNC, si no que la información transportada por estas fibras, tanto las que llegan vía PO como las procedentes del nervio vago, puede modular las funciones ováricas (Calka y col., 1988; Gerendai y col., 1995; Gerendai y col., 2000).

Calka y col. (1988) proponen que posiblemente los axones que contienen SP y CGRP estén ordenados en una relación funcionalmente recíproca con las fibras que contienen NPY en la modulación del flujo sanguíneo, con lo que se modificaría favorablemente el microambiente ovárico interno, y por tanto esta regulación podría ser importante en el desarrollo ovárico, el ciclo estral o la hipertrofia compensadora.

### **La inervación ovárica extrínseca en la modulación del desarrollo folicular**

Experimentos recientes han mostrado que el VIP y la NA aceleran la diferenciación bioquímica de los folículos recién formados porque inducen en estos la formación de receptores biológicamente activos para la FSH, sin los cuales las células foliculares no podrían responder a la presencia de la gonadotropina. De tal modo, los neurotransmisores que son aportados al ovario por la inervación extrínseca facilitan el inicio del crecimiento de los folículos ováricos (Ojeda, 1997; Mayerhofer y col., 1997; Dissen y Ojeda, 1999; Romero y col., 2002). Por otro lado, se sabe que el NPY puede contribuir a modular la respuesta de las células de la granulosa a las gonadotropinas y a las catecolaminas (Dissen y Ojeda, 1999).

### **Participación de la inervación extrínseca del ovario en la ovulación**

Varias referencias ponen de manifiesto la importancia de la información transportada por las fibras que inervan al ovario sobre la ovulación. Se ha observado que la administración de una sola dosis de valerato de estradiol a ratas hembra prepúber (Rosa-e-Silva y col., 2003) o adulta (Barria y col., 1993) induce el síndrome del ovario poliquístico, donde se pierde la ciclicidad estral, no hay ovulación y se registra un incremento de los andrógenos circulantes. Cuando se secciona el NOS en ratas con características de ovario poliquístico se restaura la ciclicidad estral, la ovulación y disminuye la concentración de andrógenos (Rosa-e-Silva y col., 2003). Otra evidencia que apoya la participación de la inervación sobre los procesos que culminan con la ovulación es el hecho de que cuando en la rata prepúber o adulta se realiza la denervación simpática por sección unilateral del NOS, se observa un descenso en la cantidad de ovocitos liberados por parte del ovario denervado, al momento de la ovulación (Chávez y

col., 1991; Morales y col., 1993) y la tasa ovulatoria no se restablece por la estimulación con gonadotropinas (Morales y col., 1998).

En la rata adulta existe una diferencia en el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo o el derecho (Domínguez y col., 1989), evento que ha sido explicado en función de la participación de la inervación simpática. Esto podría estar relacionado con una mayor densidad de fibras simpáticas en el ovario derecho con relación al izquierdo reportada por Klein y Burden (1988).

Por otra parte, se ha reportado que durante las horas que acompañan al proceso de ovulación se produce un incremento de la expresión del *trkA* en las células de la pared folicular (Dissen y col., 1996). Si se bloquea la acción del NGF se inhibe la ruptura folicular. Al parecer, además el NGF tiene la capacidad de desorganizar la comunicación celular que ocurre a través de las uniones de hendidura entre las células de la teca (Mayerhofer y col., 1996).

## **V. EFECTOS DE LA DENERVACIÓN SOBRE LAS FUNCIONES OVÁRICAS**

La información que transporta la inervación aferente y eferente al ovario participa en la regulación de las funciones gonadales (Flores y col., 1990; Gerendai y Halász, 1997 y 2000; Morales y col., 1993 y 1998, Morán y col 2003). Si bien la mayor parte de los estudios han sido enfocados hacia la participación de las fibras nerviosas simpáticas, existen evidencias de que también participan las fibras sensoriales ováricas, tanto las que llegan a través de plexo ovárico como las procedentes de nervio vago (Traurig y col., 1984 a,b; Calka y col., 1988; Carrillo y col., 1994; Gerendai y col., 2000; Razo, 2000; Apolonio, 2001; Morán, 2001, Morales y col., 2004). Se ha sugerido que la inervación extrínseca del ovario puede mediar una conexión neural entre el hipotálamo y el ovario, que puede ser en ambas direcciones (Gerendai y Halász, 1978 y 2001; Gerendai y col., 2000; Dissen y Ojeda, 1999; Morán y col., 2000a).

### **Denervación simpática**

Gerendai y Halász (1978) mostraron que en la rata hemicastrada la eliminación de las vías neurales simpáticas, por administración de la neurotoxina 6-hidroxi-dopamina (6-OHDA) inhibe la hipertrofia compensadora del ovario *in situ*. Mientras que en el animal con ambos ovarios, la eliminación de las fibras noradrenérgicas de un ovario induce en la gónada contralateral una respuesta compensatoria. Se ha reportado que en la rata

denervada por la administración de guanetidina en la etapa neonatal y evaluada al primer estro, se retarda la edad de la apertura vaginal, se reduce el volumen folicular y la concentración ovárica de progesterona (Rosa-E-Silva y col., 1997), se incrementa el número de folículos antrales pequeños (Lara y col., 1990b; Quiroz y col., 1999) se aumenta el número de ovocitos liberados (Flores y col., 1990). En tanto que si el fármaco se administra en la etapa fetal, se ha observado un retraso en el inicio de la pubertad, así como una disminución en el peso de los ovarios al primer estro (Quiroz y col., 1999). Por otra parte, cuando se elimina la inervación ovárica a ratas neonatas, por la administración del anticuerpo al factor de crecimiento neural (NGF-Ab), el desarrollo folicular se ve retardado, la pubertad se retrasa y la síntesis de estradiol por parte de la gónada se reduce (Lara y col., 1990a).

Otra metodología que ha permitido abordar la participación de la inervación en las funciones ováricas es la denervación quirúrgica. La sección bilateral del NOS, realizada en la rata adulta o prepúber, provoca alteraciones sobre la esteroidogénesis, ya que se presenta un descenso agudo en las concentraciones séricas de estradiol (Aguado y Ojeda, 1984c) y progesterona (Erskine y Weawer, 1988), que se acompañan por una depleción de hasta el 60% de la concentración de noradrenalina ovárica. La disminución en la esteroidogénesis no altera el inicio de la pubertad, evaluado por la edad de la apertura vaginal y el primer estro (Aguado y Ojeda, 1984b). Cuando se secciona el nervio ovárico superior en la rata de cuatro días de edad, la apertura vaginal y el primer diestro presentan un retraso, se pierde el patrón del ciclo estral, la concentración sérica de FSH disminuye, mientras que la concentración de estradiol se incrementa, en cuerpos lúteos disminuye la actividad de la  $20\alpha$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa (enzima que cataboliza a la progesterona) y en el ovario incrementa el contenido de noradrenalina, que se ve acompañado por un descenso en el número de receptores  $\beta$ -adrenérgicos (Forneris y Aguado, 2002).

Selstam y col. (1985) mostraron que en la rata prepúber la sección bilateral del nervio ovárico superior, seguida por la estimulación con PMSG, no modifica el número de cuerpos lúteos. Estos resultados fueron interpretados por los autores como que la información que transporta el NOS puede no ser indispensable para que se lleve a cabo la ovulación. Por su parte, Wylie y col. (1985) proponen que la inervación simpática no participa en los mecanismos que conllevan a la ruptura de la pared folicular ni al transporte de ovocitos hacia el oviducto y que los folículos podrían llegar al estadio de antrales pequeños sin la necesidad de la inervación simpática.

Estudios previos de nuestro laboratorio muestran que tanto en la rata adulta como en la prepúber la sección bilateral del NOS no modifica la cuota ovulatoria espontánea. Sin embargo, cuando se realiza la sección unilateral del nervio, la gónada denervada libera un número menor de ovocitos. Más aún, este tipo de sección realizada en la rata prepúber provoca que en la gónada intacta se presente una respuesta compensadora, semejante a lo que ocurre en un animal hemicastrado. Estos resultados han permitido sugerir que existe una comunicación neural entre los ovarios que podría ser dada por el mismo NOS (Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993, 1998).

La participación del NOS puede consistir en modular la respuesta del folículo a las gonadotropinas. Esta hipótesis se ve apoyada por el hecho de que la eliminación del NOS induce disminución en la población folicular de la gónada denervada (Morán y col., 2000b) y al hecho de que el ovario denervado no responde al estímulo exógeno con gonadotropinas (Morales y col., 1998).

### **Denervación sensorial**

Si bien la mayor parte de las evidencias reportadas hasta el momento llevan a pensar que la información transportada por las fibras sensoriales no participa en regulación de la esteroidogénesis, trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que en la rata la eliminación de las fibras sensoriales, por la administración de capsaicina al día tres de vida provoca una disminución en la concentración sérica de progesterona y estradiol al primer estro vaginal (Razo, 2000). Mientras que cuando se realiza la denervación al nacimiento, estas hormonas disminuyen cuando se evalúa al final de la etapa juvenil (Morán y col., 2001). En el animal denervado con capsaicina al nacimiento y hemicastrado al principio o al final de la etapa juvenil, ocurre una disminución en la concentración sérica de progesterona, reducción que depende de la gónada remanente y de la edad en la que se realiza la hemicastración (Apolonio, 2001). Mientras que Traurig y col. (1984) reportan que en la rata con denervación sensorial al nacimiento se produce un entretardamiento del desarrollo corporal y que el inicio de la pubertad se retrasa. De tal modo, estas evidencias permiten sugerir que la información que transportan las fibras sensoriales participa en la modulación de la esteroidogénesis.

Nance y col. (1987) observaron que en la rata adulta hemicastrada posteriormente a la administración intratecal de capsaicina, una disminución en la fertilidad y en la respuesta decidual, así como reducción en la somatostatina inmunorreactiva en el cordón espinal, si bien la hipertrofia compensadora no se ve afectada.

Por otra parte, se ha observado que en la rata la estimulación cervico-vaginal produce un estado general de analgesia. Pero que esta respuesta, se inhibe en la rata adulta que fue denervada al nacimiento con capsaicina o bien, la analgesia se ve atenuada temporalmente si la denervación se realiza en la edad adulta (Rodríguez-Sierra y col., 1988), posiblemente por la depleción de la sustancia P (y posterior muerte de las fibras sensoriales) en la vagina y cervix previamente reportada por Traurig y col. (1984a). También se ha evaluado el efecto de la denervación sensorial sobre algunos parámetros conductuales, Carrillo y col. (1994) observaron que en las ratas denervadas con capsaicina al nacimiento, presentan una menor sensibilidad a estímulos químicos nocivos, retraso en la apertura de los ojos, incremento en la actividad de acicalamiento (lo que ocasiona ulceraciones en la piel de la cabeza, del cuello y de la parte superior de los miembros anteriores). Estos animales al llegar a la etapa adulta, presentan la respuesta de lordosis pero su fertilidad disminuye (Morán y col., 2003; Rodríguez- Sierra y col., 1988).

En otros reportes, la eliminación de la inervación sensorial por la sección bilateral del nervio vago modifica el patrón de ciclicidad vaginal (Chávez y col., 1987), la secreción de prolactina (Burden y col., 1981), de gonadotropinas y de las hormonas esteroides (Lawrence y col., 1978) y bloquea la hipertrofia compensadora del ovario (Burden y Lawrence, 1977).

Ya que más del 90% de las fibras contenidas en el nervio vago son sensoriales, Burden y col. (1983) proponen que las fibras aferentes viscerales del ovario contenidas en los troncos vagales anterior y posterior pueden constituir una ruta anatómica directa, por medio de la cual podrían ser moduladas ciertas funciones ováricas en la rata, esto mediante reflejos viscerales. Por otra parte, el ganglio nodoso, que contiene fibras sensoriales, se proyecta hacia el núcleo del tracto solitario el cual presenta conexiones con núcleos hipotalámicos que controlan funciones reproductivas, lo que podría apoyar la participación de la inervación sensorial en la regulación de la reproducción (Swanson y Sawchenko, 1980, en Burden y col., 1983; Gerendai y col., 2000). En el núcleo del tracto solitario se han identificado fibras sensoriales de tipo A y C, pero sólo las fibras de tipo C fueron sensibles a la capsaicina, por tanto las fibras A debieron ser del tipo I (Bailey y col., 2002). Este conjunto de evidencias permiten sugerir un papel para la inervación sensorial más allá de la sola participación en el control del flujo sanguíneo.

## **VI. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

La función del ovario se encuentra regulada por elementos endocrinos y neurales. La inervación simpática y la sensorial, vía sistema nervioso central, participan en la modulación de los eventos que regulan el crecimiento folicular y desencadenan la ovulación.

Las evidencias experimentales apoyan la importancia fisiológica de la información neural que transportan las fibras aferentes-eferentes al ovario, sobre el funcionamiento de las gónadas. La información que transporta la inervación simpática hacia el ovario modula la biosíntesis de hormonas esteroides, el desarrollo folicular y la ovulación. Sólo algunas de las evidencias apuntan a que la inervación sensorial modula la esteroidogénesis y algunos de los eventos que desencadenan la ovulación.

Recientemente, se ha propuesto la existencia de una vía de comunicación bidireccional entre la inervación simpática y la sensorial. Esto es apoyado por el hecho de que cuando un órgano pierde las fibras nerviosas simpáticas, se presenta un aumento en el número de fibras sensoriales. De igual forma, la inervación simpática se incrementa si lo que se pierde son las fibras sensoriales. El presente estudio tiene como finalidad analizar si en el ovario se presenta este tipo de regulación bidireccional entre la información aferente-eferente ovárica en la esteroidogénesis y la ovulación, para lo cual se utilizó el modelo experimental de la rata tratada al nacimiento con capsaicina y con sección uni- o bilateral del nervio ovárico superior al final de la etapa infantil (20 días de vida) o al final de la etapa juvenil (28 días de vida).

## **VII. HIPÓTESIS**

Dado que en la rata hembra, tanto la información que transportan las fibras simpáticas, las que llegan al ovario vía nervio ovárico superior, como la que transportan las fibras sensoriales, aportadas por el plexo ovárico y el nervio vago, participan en la regulación de la función reproductiva y que al parecer, sería la inervación simpática la que se encargaría de regular las funciones del ovario, mientras que las fibras sensoriales actuarían como un traductor de la información generada en la gónada, por lo tanto, la eliminación de una o ambas vías neurales se traducirá en una disminución de la capacidad de respuesta del ovario para llevar a cabo los procesos neuroendocrinos que tienen como resultado la esteroidogénesis y la ovulación.

## **VIII. OBJETIVO GENERAL**

- Analizar el efecto de la denervación sensorial-simpática sobre el inicio de la pubertad, la esteroidogénesis y la ovulación, tomando como modelo la rata prepúber.

## **IX. OBJETIVOS PARTICULARES**

- Analizar los efectos al primer estro vaginal de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a los 20 ó 28 días de edad sobre el inicio de la pubertad (edad de canalización vaginal) en ratas hembra con denervación sensorial realizada al nacimiento.

- Analizar los efectos al primer estro vaginal de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a los 20 ó 28 días de edad sobre las concentraciones séricas de progesterona, testosterona y  $17\beta$ -estradiol, en ratas hembra con denervación sensorial realizada al nacimiento.

- Analizar los efectos al primer estro vaginal de la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior, realizada a los 20 ó 28 días de edad sobre la ovulación, en ratas hembra con denervación sensorial realizada al nacimiento.

## X. MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron ratas hembra recién nacidas de la cepa CII-ZV, mantenidas bajo condiciones controladas de iluminación con 14 h de luz y 10 h de oscuridad (luces encendidas de 05:00 a 19:00 h.). El día de nacimiento (día cero) se procedió a sexar a las crías y colocarlas en camadas de 6 individuos (5 hembras y un macho) para evitar alteraciones en el desarrollo del Sistema Nervioso Central y el aparato reproductor del animal (Salas y col., 1991).

Los individuos se distribuyeron de manera aleatoria en dos grupos experimentales: uno de ellos fue inyectado al nacimiento con capsaicina (Cap-n) y el otro con vehículo (Vh-n).

Grupo inyectado con capsaicina al nacimiento (Cap-n).

A este grupo se le inyectó de forma subcutánea, al nacimiento una dosis única de  $50 \text{ mg}\cdot\text{Kg}^{-1}$  de capsaicina (Sigma Chemical Co., St. Louis Mo. USA), en un volumen equivalente a  $10 \mu\text{l}$  por cada gramo de peso corporal. La capsaicina fue preparada de la siguiente forma: se disolvió el fármaco en una solución que consta de 10% de etanol absoluto, 10% de Tween-80 y 80% de solución salina (NaCl al 0.9%).

Grupo inyectado con vehículo al nacimiento (Vh-n).

A este grupo se le inyectó al nacimiento únicamente el vehículo, que estuvo constituido por la solución utilizada para disolver la capsaicina, en el mismo volumen que se utilizó para el grupo anterior.

Las ratas permanecieron con la madre hasta que fueron destetadas, esto es, hasta los 21 días de vida con libre acceso al agua y alimento. A los 20 ó 28 días de vida, los miembros de los grupos mencionados anteriormente fueron distribuidos aleatoriamente en alguno de los siguientes grupos:

### **Sección del nervio ovárico superior**

Después de anestésiar a los animales con éter, se procedió a realizar en el costado una incisión longitudinal en la piel y el músculo, de aproximadamente 0.8 cm de largo, para permitir el acceso al ligamento suspensorio, izquierdo, derecho o ambos, el cual contiene al nervio ovárico superior (NOS). Se aisló el tejido circundante del NOS y el nervio fue seccionado. Se regresó el ovario a la cavidad abdominal y se suturó la herida.

### **Operación simulada (OS)**

Una vez anestesiados los animales se procedió a realizar una operación simulada, la cual consistió en realizar en el costado del animal, una incisión longitudinal en piel y músculo y sin tocar algún órgano se procedió a suturar la herida.

Todas las cirugías se realizaron entre las 09:00 y las 12:00 h., se registró el peso corporal de cada animal antes de comenzar la operación. Después de la cirugía, los organismos fueron devueltos a sus jaulas.

En todas las ratas utilizadas en este trabajo, se revisó diariamente la canalización de la vagina a partir del día 30 de vida, como un indicador del inicio de la etapa puberal. Una vez ocurrida la apertura vaginal espontánea, se procedió a realizar frotis vaginales, para determinar la etapa del ciclo estral. Todos los animales fueron sacrificados el día que presentaron el primer estro vaginal.

### **Procedimiento de autopsia**

Al primer estro vaginal, se registró el peso corporal de los animales y se les sacrificó por decapitación entre las 11:00 y las 13:00 h, se colectó la sangre del tronco y se mantuvo a temperatura ambiente durante 30 minutos, después de este tiempo, las muestras fueron colocadas en una centrifuga clínica y se centrifugaron a 3000 r.p.m. durante 15 minutos. El suero obtenido de cada animal fue aislado del botón celular, colocado en tubos eppendorf y almacenado a -20 °C hasta el momento de la cuantificación de hormonas esteroides y gonadotropinas.

Se disecaron los oviductos para detectar la presencia de ovocitos, siguiendo la metodología habitual de laboratorio (Morales y col., 1998). De igual forma, se disecaron y pesaron por separado los ovarios, útero, timo, adrenales y bazo.

### **Cuantificación de hormonas esteroides y de gonadotropinas**

Las hormonas esteroides fueron cuantificadas por radioinmunoanálisis (RIA) de fase sólida, mediante reactivos comerciales (Coat-A-Count), mientras que para las gonadotropinas se utilizó el RIA de doble anticuerpo. En tubos de polipropileno, que ya contienen el anticuerpo específico: anti-estradiol-  $I^{125}$ , anti-progesterona-  $I^{125}$  o anti-testosterona-  $I^{125}$ , se adicionaron 100  $\mu$ l de la muestra problema y 1 ml de la hormona-  $I^{125}$ . Para favorecer la reacción, la mezcla se agitó en un vortex durante 1 minuto y se incubó durante 3 h a temperatura ambiente. Después de este tiempo, la muestra fue decantada, se removió el exceso de líquido y se determinó la concentración de hormona en la muestra problema con la ayuda de un contador de rayos gamma modelo Cobra 5005, Packard <sup>TM</sup>, en función de las cuentas por minuto y una curva de calibración.

Los coeficientes intra e interensayo para la progesterona fue de 8.35, 9.45 respectivamente; para testosterona de 9.65, 10.2 y para el estradiol de 8.12 y 9.28.

Para la cuantificación de LH y FSH, se procedió de la siguiente forma: a 100  $\mu$ l de suero problema, se le añadieron 100  $\mu$ l de hormona marcada con  $I^{125}$ , posteriormente se adicionó el anticuerpo de suero de borrego para LH (rLH-RP2) o para FSH (rFSH-RP2), se incubó a temperatura ambiente por 24 h. A continuación, se agregaron 100  $\mu$ l del segundo anticuerpo (suero normal de conejo) y se incubó durante 2 h, posteriormente los tubos se centrifugaron a 3000 r.p.m. a -4 °C por 30 minutos, el sobrenadante se decantó, se secaron las paredes de cada tubo y se colocaron, para su análisis, en un contador de centelleo gamma modelo Cobra 5005, Packard <sup>TM</sup>.

### **Análisis estadístico**

Los datos del peso corporal, del peso de los órganos, las concentraciones plasmáticas de las hormonas esteroides o peptídicas fueron analizados por la prueba de "t" de Student. El número de ovocitos liberados, la edad de la apertura vaginal y del primer estro fueron analizados por la prueba de Kruskal-Wallis, seguida por la prueba de U de Mann-Whitney. La tasa de animales ovulantes, el número de animales que ovulan/número total de animales, se analizó por la prueba exacta de Fisher para proporciones. Se consideraron como estadísticamente significativas aquellas diferencias cuya probabilidad fue igual o menor al 0.05.

## XI. RESULTADOS

En el presente estudio se analizó la posibilidad de que el tratamiento con vehículo al nacimiento a animales sometidos a la operación simulada realizada a los 20 ó 28 días de edad, modifica alguno de los parámetros evaluados en comparación con los animales intactos, testigo absoluto, sacrificados en el día del primer estro vaginal.

En los animales tratados con vehículo y sometidos a la operación simulada a los 20 días de edad, se observó un retraso en la aparición del primer estro vaginal, aumento en el número de ovocitos liberados por animal ovulante y una menor concentración plasmática de estradiol. Cuando la operación simulada se realizó a los 28 días de edad se observó adelanto en la edad de la apertura vaginal (Tabla 1).

**Tabla 1.** Media  $\pm$  eem de la edad de apertura vaginal, de la edad del primer estro vaginal, del número total de ovocitos liberados, del peso corporal (g), del peso de ambos ovarios, del útero (mg/100 g.p.c.) y de las concentraciones séricas de progesterona (ng/ml) y 17  $\beta$ -estradiol (pg/ml) de animales testigo absoluto y de animales tratados con vehículo al nacimiento (Vh-n) y con operación simulada (OS) a los 20 ó 28 días de edad y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

Parámetro	Testigo absoluto	Vh-n+OS20d	Vh-n+OS28d
Edad de apertura vaginal	40.3 $\pm$ 0.6	38.4 $\pm$ 0.8	37.4 $\pm$ 0.8 $\blacklozenge$
Primer estro vaginal *	0.8 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 1.1 $\blacklozenge$	2.0 $\pm$ 0.6
Número total de ovocitos liberados	8.0 $\pm$ 0.4	9.6 $\pm$ 0.5 $\blacklozenge$	7.5 $\pm$ 0.9
Peso corporal	116.7 $\pm$ 3.0	125.6 $\pm$ 5.3	118.0 $\pm$ 3.5
Peso de ambos ovarios	32.2 $\pm$ 3.7	33.4 $\pm$ 1.9	30.9 $\pm$ 1.8
Peso del útero	157.3 $\pm$ 8.9	137.0 $\pm$ 9.7	142.8 $\pm$ 5.0
Concentración de progesterona	5.4 $\pm$ 1.1	5.4 $\pm$ 0.9	5.9 $\pm$ 0.9
Concentración de 17 $\beta$ -estradiol	20.3 $\pm$ 1.5	12.0 $\pm$ 1.7 $\clubsuit$	22.8 $\pm$ 4.5

\* Días posteriores a la apertura vaginal.

$\blacklozenge$  p < 0.05 vs. testigo absoluto, prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney.

$\clubsuit$  p < 0.05 vs. testigo absoluto, prueba de "t" Student

## SECCIÓN DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR EN ANIMALES DE 20 DÍAS

### Edad de apertura vaginal y periodo en días entre la apertura vaginal y la aparición del primer estro (APE)

En las hembras tratadas con capsaicina al nacimiento la sección del NOS izquierdo o bilateral resultó en un retraso en la edad de la apertura vaginal. En las ratas inyectadas con capsaicina al nacimiento, la sección uni- o bilateral del NOS no alteró el tiempo que transcurre entre la apertura vaginal y el primer estro (Tabla 2).

**Tabla 2.** Media  $\pm$  eem de la edad (en días) de la apertura vaginal y del periodo en días entre la apertura vaginal y la aparición del primer estro (APE), de animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 20 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

Grupo	Apertura vaginal	APE
Vh-n+OS (9)	38.4 $\pm$ 0.8	3.8 $\pm$ 1.1
Cap-n+OS (7)	38.3 $\pm$ 0.9	1.4 $\pm$ 0.7
Vh-n+SNOI (15)	37.3 $\pm$ 0.4	1.4 $\pm$ 0.5
Cap-n+SNOI (11)	40.4 $\pm$ 0.8*	1.4 $\pm$ 0.6
Vh-n+SNOD (10)	37.5 $\pm$ 0.6	1.8 $\pm$ 0.6
Cap-n+SNOD (7)	38.9 $\pm$ 1.0	3.4 $\pm$ 1.2
Vh-n+SBNO (10)	36.9 $\pm$ 0.8	1.4 $\pm$ 0.5
Cap-n+SBNO (8)	40.8 $\pm$ 1.0♣	0.8 $\pm$ 0.4

( ) Número de animales por grupo.

\* p<0.05 vs. Vh-n+SNOI, prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney.

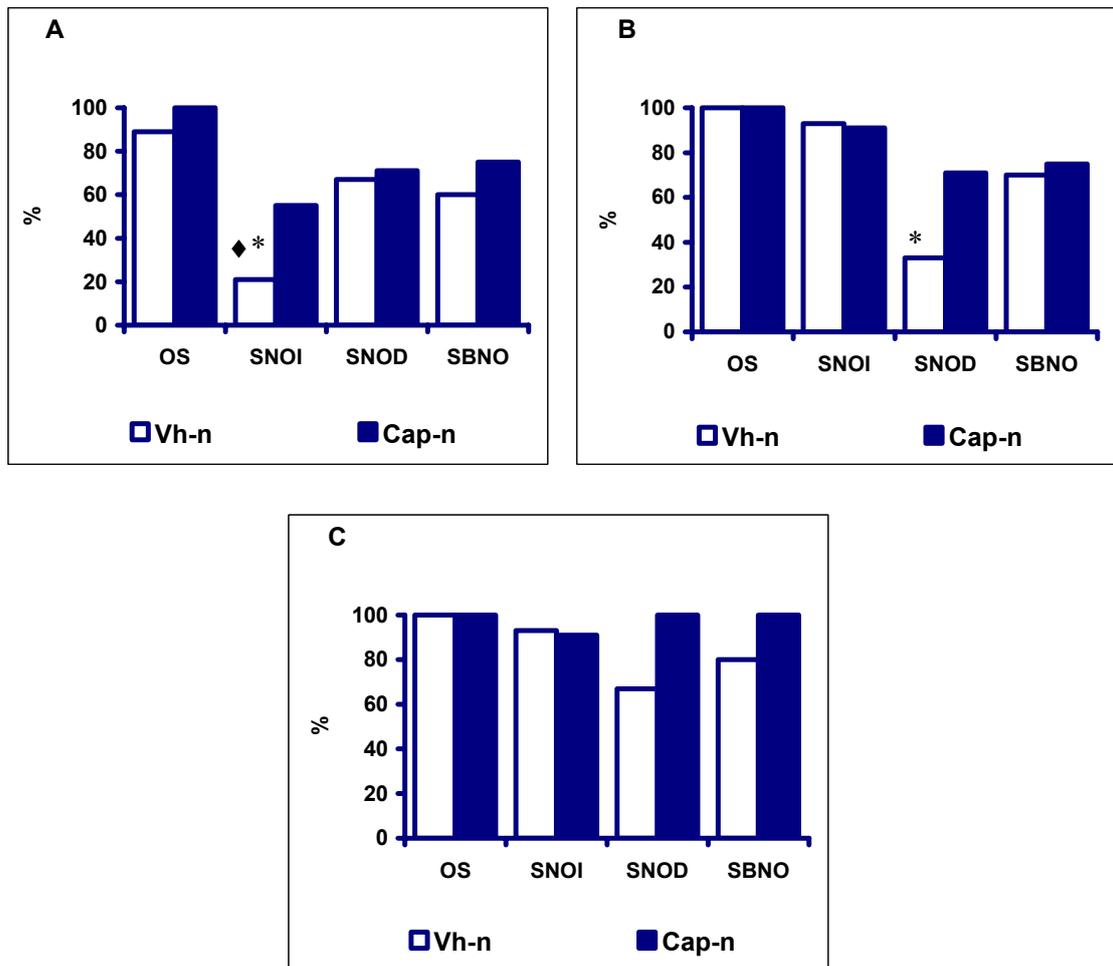
♣ p<0.05 vs. Vh-n+SBNO, prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney.

### Tasa de animales ovulantes

En el grupo tratado con vehículo al nacimiento al que se realizó la sección del NOS izquierdo, se observó una disminución en la tasa de animales ovulantes por el ovario izquierdo, con respecto al animal sometido a operación simulada y a su ovario contralateral (Figura 5A). De igual manera, con la sección del NOS derecho disminuyó la tasa ovulatoria por el ovario denervado (Figura 5B). Cuando los resultados son expresados como el porcentaje de animales que ovulan por ambos ovarios, no se

observaron cambios significativos (Figura 5C). En las hembras tratadas con capsaicina al nacimiento la sección unilateral o bilateral del NOS no modificó el porcentaje de animales que ovuló al primer estro vaginal, respecto al grupo tratado con vehículo (Figura 5A, B y C).

**Figura 5.** Tasa de animales ovulantes para el ovario izquierdo (A), derecho (B) y ambos (C) de animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 20 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.



\*  $p < 0.05$  vs. Vh-n+OS, prueba de Fisher.

♦  $p < 0.05$  vs. su ovario contralateral, prueba de Fisher.

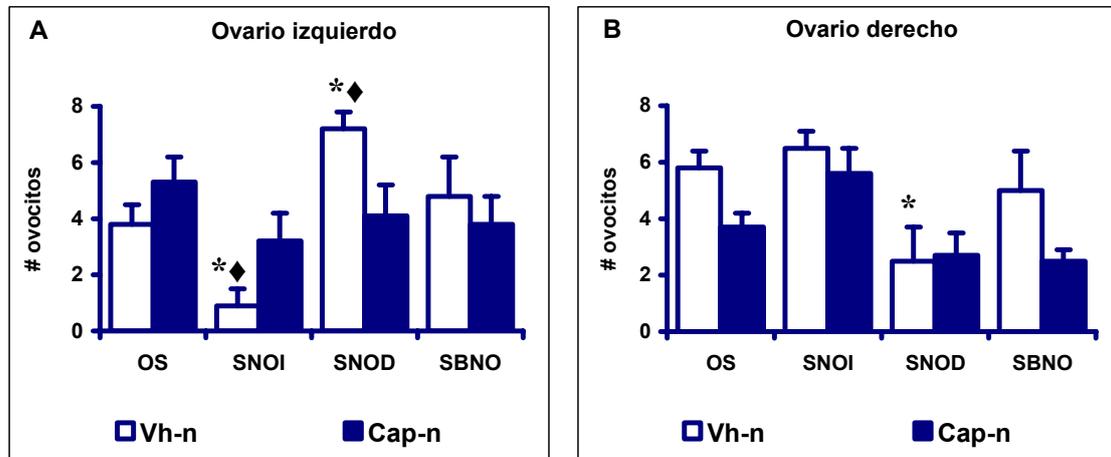
## Número de ovocitos liberados

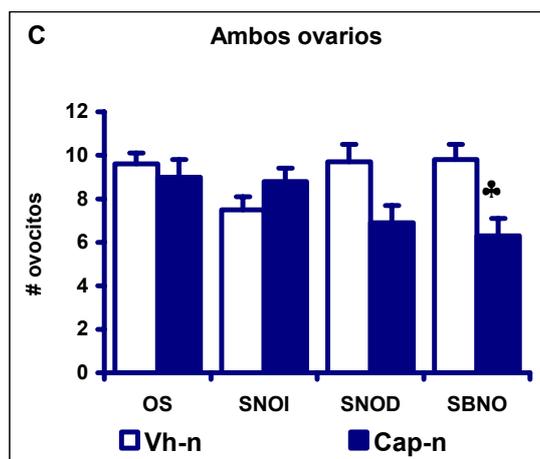
En el animal tratado con vehículo al nacimiento y con sección unilateral del NOS resultó en una disminución del número de ovocitos liberados por el ovario denervado con respecto al animal con operación simulada y a su ovario contralateral.

En el grupo tratado con vehículo la sección del NOS derecho resultó en un mayor número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (Figura 6A). En el animal tratado con capsaicina y sometido a operación simulada, el número de ovocitos liberados por el ovario derecho fue menor que en el grupo tratado con vehículo (Figura 6B). En las hembras tratadas con capsaicina, la sección bilateral del NOS resultó en la disminución del número total de ovocitos liberados respecto al animal tratado con vehículo (Figura 6C).

La sección del NOS derecho en el animal con o sin tratamiento de capsaicina libera un número de ovocitos similar al del grupo con operación simulada (Figuras 6A, 6B y 6C).

**Figura 6.** Media  $\pm$  eem del número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo (A), derecho (B) y ambos (C), en animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 20 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.





\*  $p < 0.05$  vs. Vh-n+OS, prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney.

♣  $p < 0.05$  vs. Vh-n+SBNO, prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney.

♦  $p < 0.05$  vs. su ovario contralateral, prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney.

### **Peso corporal (g)**

En el grupo tratado con capsaicina al nacimiento y sometido a la operación simulada se observó un menor crecimiento corporal, respecto a las tratadas con vehículo. Este hecho no se observa si además se realiza sección del NOS izquierdo, derecho o ambos (Tabla 3).

### **Peso de Ovarios**

En las hembras tratadas con capsaicina la sección uni o bilateral del NOS no afectó el peso del ovario izquierdo o derecho respecto al grupo tratado con vehículo (Tabla 3).

**Tabla 3.** Media  $\pm$  eem del peso corporal (g) y el peso (en mg/100 g de peso corporal) del ovario izquierdo, ovario derecho y ambos, en animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 20 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

<b>Grupo</b>	<b>Peso Corporal</b>	<b>Ovario izquierdo</b>	<b>Ovario Derecho</b>	<b>Ambos ovarios</b>
<b>Vh-n+OS (9)</b>	125.6 $\pm$ 5.3	15.8 $\pm$ 1.2	17.6 $\pm$ 1.1	33.4 $\pm$ 1.9
<b>Cap-n+OS (7)</b>	107.7 $\pm$ 5.9*	18.9 $\pm$ 1.8	17.3 $\pm$ 1.9	36.2 $\pm$ 3.0
<b>Vh-n+SNOI (14)</b>	118.6 $\pm$ 3.5	15.7 $\pm$ 1.4	18.3 $\pm$ 1.1	34.0 $\pm$ 1.0
<b>Cap-n+SNOI (11)</b>	116.5 $\pm$ 3.0	16.1 $\pm$ 0.9	20.2 $\pm$ 1.7	35.9 $\pm$ 2.1
<b>Vh-n+SNOD (9)</b>	114.4 $\pm$ 2.6	18.4 $\pm$ 2.0	17.3 $\pm$ 3.6	35.7 $\pm$ 5.2
<b>Cap-n+SNOD (7)</b>	119.9 $\pm$ 4.5	17.3 $\pm$ 1.4	12.2 $\pm$ 2.1	29.5 $\pm$ 2.6
<b>Vh-n+SBNO (10)</b>	113.2 $\pm$ 3.8	14.9 $\pm$ 2.0	14.2 $\pm$ 2.2	29.1 $\pm$ 2.9
<b>Cap-n+SBNO (8)</b>	115.3 $\pm$ 2.5	15.7 $\pm$ 1.2	14.2 $\pm$ 1.3	29.9 $\pm$ 2.1

( ) Número de animales por grupo.

\*  $p < 0.05$  vs. Vh-n+OS, prueba de t-student.

### Útero y adrenales

En las hembras tratadas al nacimiento con capsaicina y sometidas a la operación simulada o la sección uni o bilateral del NOS, no se observaron cambios en el peso del útero y de las adrenales (Tabla 4).

En el grupo tratado al nacimiento con capsaicina y sometida a la sección del NOS derecho se observó un incremento del peso del útero, si se compara contra el grupo con denervación sensorial y operación simulada: 161.2  $\pm$  10.1 vs. 122.9  $\pm$  8.3,  $p < 0.05$  prueba de t-student.

**Tabla 4.** Media  $\pm$  eem del peso (en mg/100 g de peso corporal) del útero, adrenal izquierda y adrenal derecha, en animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 20 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

<b>Grupo</b>	<b>Útero</b>	<b>Adrenal izquierda</b>	<b>Adrenal Derecha</b>
<b>Vh-n+OS (9)</b>	137.0 $\pm$ 9.7	13.4 $\pm$ 1.0	12.2 $\pm$ 1.1
<b>Cap-n+OS (7)</b>	122.9 $\pm$ 9.2	15.9 $\pm$ 1.5	15.2 $\pm$ 1.0
<b>Vh-n+SNOI (14)</b>	141.3 $\pm$ 6.2	13.7 $\pm$ 0.8	13.7 $\pm$ 0.5
<b>Cap-n+SNOI (11)</b>	131.5 $\pm$ 8.3	15.3 $\pm$ 1.2	13.5 $\pm$ 1.0
<b>Vh-n+SNOD (9)</b>	144.0 $\pm$ 7.9	15.7 $\pm$ 0.9	13.3 $\pm$ 0.7
<b>Cap-n+SNOD (7)</b>	161.2 $\pm$ 10.1	13.6 $\pm$ 0.8	13.8 $\pm$ 0.7
<b>Vh-n+SBNO (10)</b>	134.8 $\pm$ 7.1	16.2 $\pm$ 1.8	14.1 $\pm$ 0.8
<b>Cap-n+SBNO (8)</b>	130.7 $\pm$ 7.6	15.7 $\pm$ 1.2	13.8 $\pm$ 0.9

( ) Número de animales por grupo.

#### **Timo y bazo**

En las hembras tratadas al nacimiento con capsaicina y sometidas a la operación simulada o la sección uni o bilateral del NOS, no se observaron cambios significativos en el peso del timo y del bazo (Tabla 5).

**Tabla 5.** Media  $\pm$  eem del peso (en mg/100 g de peso corporal) del timo y bazo, en animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 20 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

<b>Grupo</b>	<b>Timo</b>	<b>Bazo</b>
<b>Vh-n+OS (9)</b>	288.9 $\pm$ 17.2	359.5 $\pm$ 57.5
<b>Cap-n+OS (7)</b>	324.0 $\pm$ 17.7	347.4 $\pm$ 18.7
<b>Vh-n+SNOI (14)</b>	299.0 $\pm$ 6.7	379.7 $\pm$ 60.3
<b>Cap-n+SNOI (11)</b>	298.7 $\pm$ 11.9	413.6 $\pm$ 61.5
<b>Vh-n+SNOD (9)</b>	294.1 $\pm$ 13.0	376.5 $\pm$ 66.5
<b>Cap-n+SNOD (7)</b>	298.1 $\pm$ 21.1	381.0 $\pm$ 44.7
<b>Vh-n+SBNO (10)</b>	307.2 $\pm$ 9.4	357.4 $\pm$ 33.1
<b>Cap-n+SBNO (8)</b>	337.6 $\pm$ 22.0	357.8 $\pm$ 24.9

( ) Número de animales por grupo.

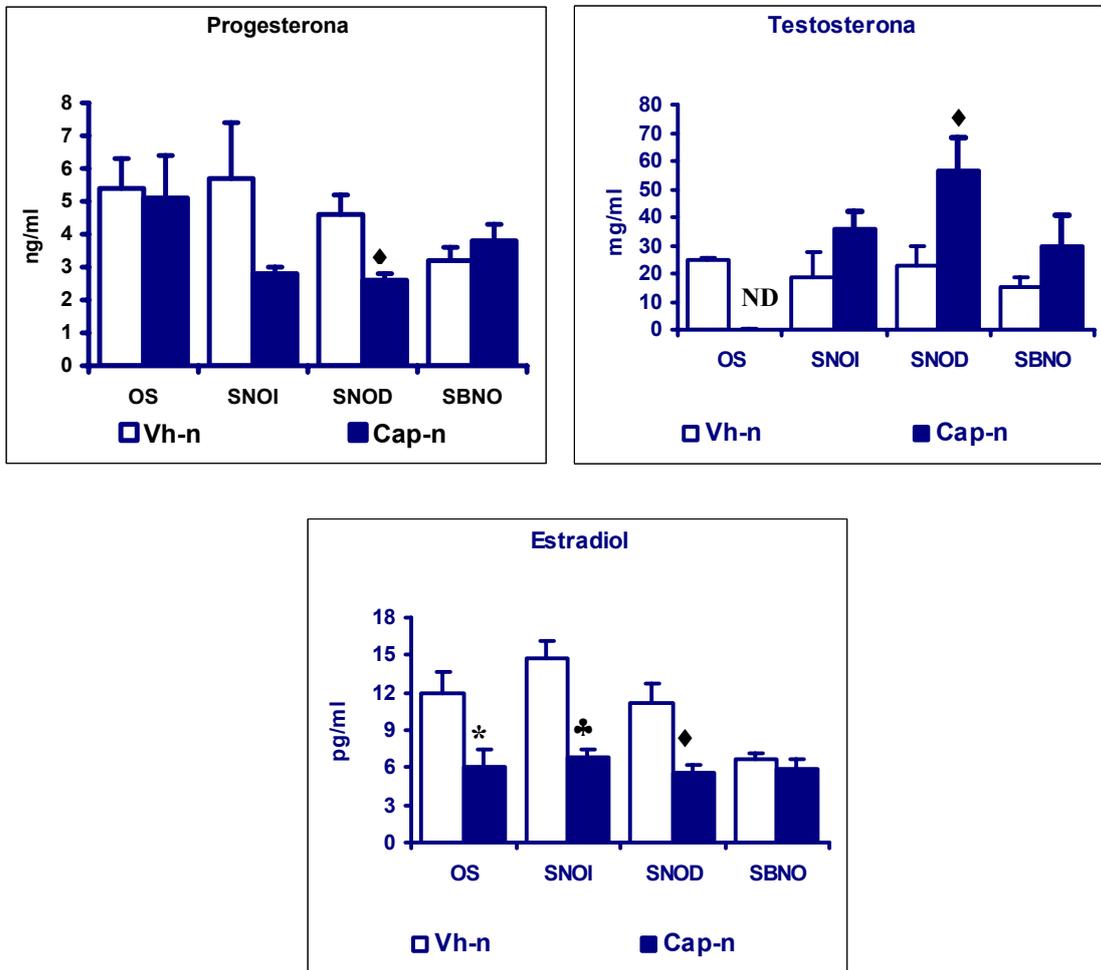
## **Hormonas esteroides**

En el animal tratado al nacimiento con vehículo y sometido a sección bilateral del NOS se observó una disminución en la concentración de progesterona, comparada con el grupo inyectado con vehículo y sometido a la operación simulada:  $3.2 \pm 0.4$  vs.  $5.4 \pm 0.9$ ,  $p < 0.05$  prueba "t" Student. En las hembras tratadas con capsaicina y con sección del nervio ovárico derecho disminuyó la concentración de progesterona, comparado con el grupo de vehículo y la misma operación. Este mismo comportamiento se observó cuando se seccionó el NOS izquierdo pero la diferencia no fue estadísticamente significativa. La sección bilateral del NOS provocó una menor concentración de progesterona comparado con el grupo tratado con vehículo y operación simulada (Figura 7A).

El tratamiento con vehículo al nacimiento y sección bilateral del NOS resultó en una disminución de la concentración de testosterona, comparada con el grupo inyectado con vehículo y con operación simulada:  $15.5 \pm 2.8$  vs.  $24.8 \pm 0.9$   $p < 0.05$  prueba "t" Student. En las ratas tratadas con capsaicina y sección del nervio ovárico derecho resultó un una mayor concentración de testosterona, comparado con el grupo de vehículo (Figura 7B).

En la rata hembra tratada al nacimiento con vehículo y sometida a la sección bilateral del NOS se observó una menor concentración de estradiol, comparada con el grupo inyectado con vehículo y con operación simulada:  $6.7 \pm 0.5$  vs.  $12.0 \pm 1.7$   $p < 0.05$  prueba "t" Student. En los animales tratados con capsaicina al nacimiento y con sección izquierda o derecha del NOS se observó una menor concentración de estradiol (Figura 7C).

**Figura 7.** Concentración sérica de hormonas esteroides: progesterona, testosterona y 17  $\beta$ -estradiol de animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 20 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.



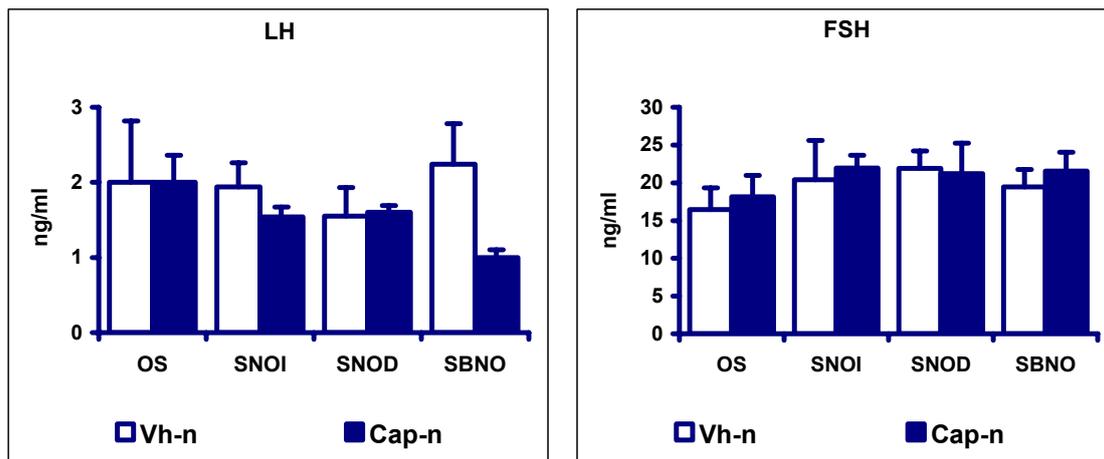
\* p<0.05 vs. Vh-n+OS, prueba de t-student.  
 ♣ p<0.05 vs. Vh-n+SNOI, prueba de t-student.  
 ♦ p<0.05 vs. Vh-n+SNOD, prueba de t-student.  
 ND: No detectable.

### Gonadotropinas

En el animal con denervación sensorial la sección bilateral del NOS resultó en una disminución de la concentración de LH, respecto al animal inyectado con capsaicina al nacimiento y sometido a la operación simulada ( $1.0 \pm 0.1$  vs.  $2.0 \pm 0.4$  p<0.05 prueba "t" student). En las hembras tratadas al nacimiento con capsaicina la sección uni o bilateral

del NOS no se observó cambios significativos en la concentración sérica de LH o FSH (Figura 8).

**Figura 8.** Concentración sérica de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona estimulante del folículo (FSH) en ng/ml, de animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 20 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.



## SECCIÓN DEL NERVIO OVÁRICO SUPERIOR EN ANIMALES DE 28 DÍAS

### Edad de apertura vaginal y periodo en días entre la apertura vaginal y la aparición del primer estro (APE)

En el animal con denervación sensorial que fue sometido a operación simulada se observó un retraso significativo en la edad de apertura vaginal (Tabla 6). El periodo, días, entre la apertura vaginal y la aparición del primer estro no presentó diferencias significativas por la sección uni o bilateral del NOS (Tabla 6).

**Tabla 6.** Media  $\pm$  eem de la edad de apertura vaginal y del periodo en días entre la apertura vaginal y la aparición del primer estro (APE), de animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 28 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

Grupo	Apertura vaginal	APE (días)
Vh-n+OS (11)	37.4 $\pm$ 0.8	2.0 $\pm$ 0.6
Cap-n+OS (8)	40.6 $\pm$ 0.9*	2.4 $\pm$ 0.8
Vh-n+SNOI (12)	37.3 $\pm$ 0.9	1.5 $\pm$ 0.5
Cap-n+SNOI (9)	38.0 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 0.8
Vh-n+SNOD (12)	37.7 $\pm$ 0.7	2.1 $\pm$ 0.7
Cap-n+SNOD (10)	39.6 $\pm$ 1.2	2.6 $\pm$ 0.7
Vh-n+SBNO (8)	39.9 $\pm$ 0.7	2.8 $\pm$ 1.3
Cap-n+SBNO (6)	38.3 $\pm$ 0.6	2.3 $\pm$ 1.1

( ) Número de animales por grupo

\* p <0.05 vs. Vh-n+OS, prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney.

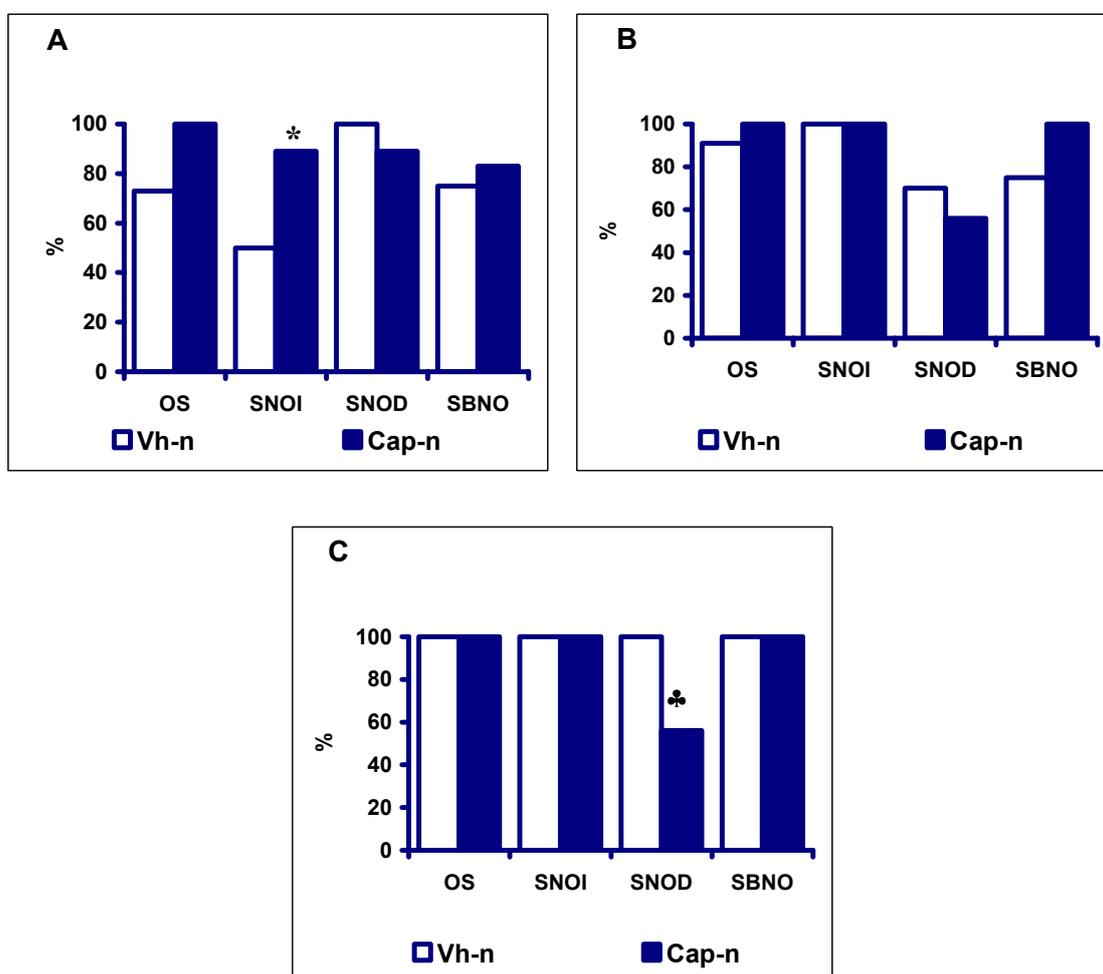
### Tasa de animales ovulantes

Las ratas inyectadas con vehículo y con sección del nervio ovárico izquierdo, exhibieron un menor porcentaje de ovulación por el ovario izquierdo, comparado con el observado por la gónada derecha del mismo grupo: 50% vs. 100%, p<0.05 prueba de Fisher.

En las hembras tratadas con capsaicina al nacimiento y sometidas a la sección del NOS izquierdo, el porcentaje de animales que ovuló por el ovario izquierdo fue significativamente mayor que el grupo inyectado con vehículo (Figura 9A). La tasa

ovulatoria del ovario derecho no se modificó de manera significativa en respuesta a la sección uni o bilateral del nervio ovárico superior (Figura 9B). Cuando se consideró el porcentaje de animales que ovuló por ambos ovarios se observó que en las ratas inyectadas con capsaicina y sometidas a la sección del NOS derecho, este parámetro fue significativamente menor que el grupo con vehículo (Figura 9C).

**Figura 9.** Tasa de animales ovulantes para el ovario izquierdo (A), derecho (B) y ambos (C) de animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 28 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.



\*  $p < 0.05$  vs. Vh-n+SNOI, prueba de Fisher.

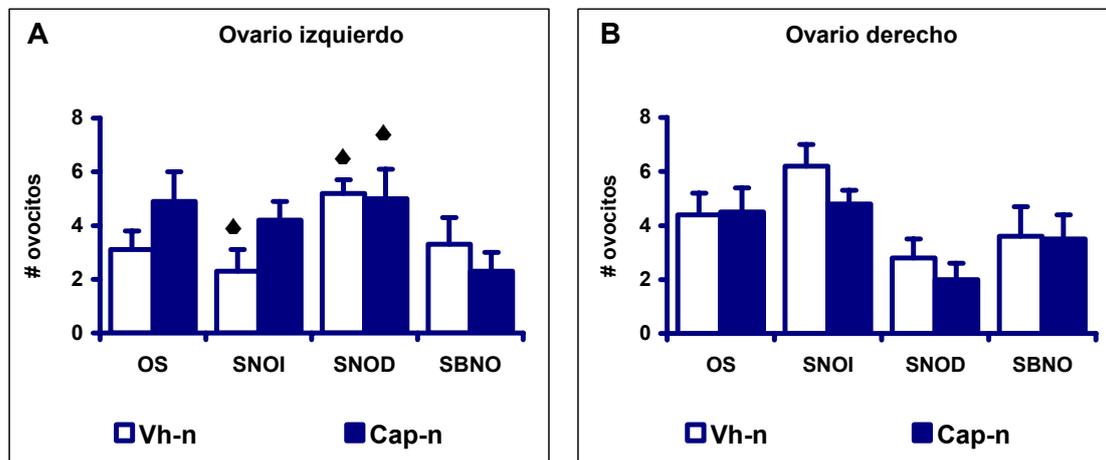
♣  $p < 0.05$  vs. Vh-n+SNOD, prueba de Fisher.

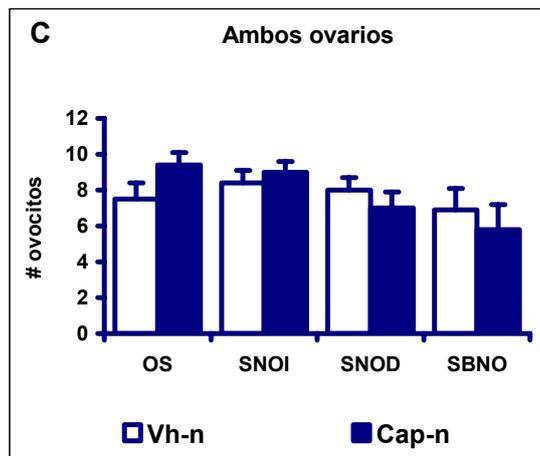
### Número de ovocitos liberados

En los animales tratados al nacimiento con vehículo, la sección unilateral o bilateral del NOS no modificó de manera significativa el número de ovocitos liberados por el ovario izquierdo, derecho o por ambos ovarios (Figuras 10A, 10B y 10C). Es importante señalar que en las hembras tratadas con vehículo, la sección unilateral del NOS resultó en una disminución del número de ovocitos liberados por el ovario denervado, comparado con el ovario que conservó sus fibras simpáticas tanto en el grupo tratado con vehículo: Vh-n+SNOI  $2.3 \pm 0.8$  vs.  $6.2 \pm 0.8$ , y Vh-n+SNOD  $2.8 \pm 0.7$  vs.  $5.2 \pm 0.5$ ,  $p < 0.05$  prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney, como en el tratado con capsaicina:  $5.0 \pm 1.1$  vs.  $2.0 \pm 0.6$ ,  $p < 0.05$  prueba de Kruskal-Wallis seguida por "U" de Mann-Whitney.

En el grupo con denervación sensorial y con sección bilateral del NOS se observó una disminución en el número total de ovocitos liberados en comparación con el grupo tratado con capsaicina y sometido a una operación simulada ( $5.8 \pm 1.4$  vs.  $9.4 \pm 0.7$ ,  $p < 0.05$  prueba U de Mann-Whitney ).

**Figura 10.** Media  $\pm$  eem del número de ovocitos liberados para el ovario izquierdo (A), derecho (B) y ambos (C), en animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 28 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.





♦  $p < 0.05$  vs. su ovario contralateral, prueba Kruskal-Wallis seguida por “U” de Mann-Whitney.

### **Peso corporal (g)**

En las hembras inyectadas al nacimiento con capsaicina y sometidas a la sección uni o bilateral del NOS no se observó cambios significativos en el peso corporal, comparado con los grupos inyectados con (Tabla 7).

### **Peso de Ovario**

En el grupo de animales tratados con capsaicina al nacimiento y con sección bilateral del NOS resultó en un incremento del peso del ovario derecho, comparado con su grupo con vehículo. Este incremento se mantiene cuando los resultados son expresados como el peso de ambos ovarios (Tabla 7).

**Tabla 7.** Media  $\pm$  eem del peso corporal (g) y el peso (en mg/100 g de peso corporal) del ovario izquierdo, ovario derecho y ambos, en animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 28 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

<b>Grupo</b>	<b>Peso Corporal</b>	<b>Ovario izquierdo</b>	<b>Ovario Derecho</b>	<b>Ambos ovarios</b>
<b>Vh-n+OS (11)</b>	118.0 $\pm$ 3.5	14.7 $\pm$ 1.0	16.2 $\pm$ 1.1	30.9 $\pm$ 1.8
<b>Cap-n+OS (8)</b>	114.8 $\pm$ 2.6	15.8 $\pm$ 1.6	16.0 $\pm$ 1.2	31.8 $\pm$ 2.0
<b>Vh-n+SNOI (10)</b>	112.1 $\pm$ 3.6	14.2 $\pm$ 2.3	17.9 $\pm$ 1.4	32.2 $\pm$ 2.4
<b>Cap-n+SNOI (9)</b>	121.2 $\pm$ 4.7	17.6 $\pm$ 1.0	16.6 $\pm$ 0.8	34.2 $\pm$ 1.5
<b>Vh-n+SNOD (11)</b>	117.8 $\pm$ 5.0	14.9 $\pm$ 1.0	15.7 $\pm$ 1.5	30.6 $\pm$ 2.0
<b>Cap-n+SNOD (9)</b>	115.0 $\pm$ 3.1	18.1 $\pm$ 1.6	14.0 $\pm$ 1.6	32.1 $\pm$ 2.0
<b>Vh-n+SBNO (8)</b>	117.4 $\pm$ 5.2	13.1 $\pm$ 1.4	13.9 $\pm$ 1.8	28.6 $\pm$ 3.2
<b>Cap-n+SBNO (6)</b>	118.4 $\pm$ 6.7	16.3 $\pm$ 1.2	21.1 $\pm$ 1.1*	37.4 $\pm$ 2.0*

( ) Número de animales por grupo.

\*  $p < 0.05$  vs. Vh-n+SNOB, prueba de t-student.

### **Útero y Adrenales**

En las hembras inyectadas con capsaicina la sección uni o bilateral del NOS no se observó cambios significativos en el peso del útero, comparado con los grupos con vehículo. En el grupo con capsaicina y sección del nervio ovárico izquierdo se observó incremento en el peso de las adrenales, que no llegó a ser estadísticamente significativo para la adrenal izquierda (Tabla 8).

**Tabla 8.** Media  $\pm$  eem del peso (en mg/100 g de peso corporal) del útero, adrenal izquierda, adrenal derecha y ambas, en animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 28 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

<b>Grupo</b>	<b>Útero</b>	<b>Adrenal izquierda</b>	<b>Adrenal Derecha</b>	<b>Ambas Adrenales</b>
<b>Vh-n+OS (11)</b>	142.8 $\pm$ 5.0	14.4 $\pm$ 0.9	14.8 $\pm$ 0.7	29.2 $\pm$ 1.5
<b>Cap-n+OS (8)</b>	145.8 $\pm$ 7.8	16.4 $\pm$ 1.3	16.4 $\pm$ 1.6	32.6 $\pm$ 2.5
<b>Vh-n+SNOI (10)</b>	134.1 $\pm$ 3.2	13.9 $\pm$ 1.1	13.3 $\pm$ 0.7	27.2 $\pm$ 1.6
<b>Cap-n+SNOI (9)</b>	141.6 $\pm$ 9.2	16.4 $\pm$ 0.9	15.3 $\pm$ 0.5*	31.7 $\pm$ 1.4*
<b>Vh-n+SNOD (11)</b>	142.4 $\pm$ 7.5	14.8 $\pm$ 0.5	14.3 $\pm$ 0.8	29.1 $\pm$ 1.1
<b>Cap-n+SNOD (9)</b>	144.6 $\pm$ 6.7	13.8 $\pm$ 0.7	13.1 $\pm$ 0.7	26.9 $\pm$ 1.2
<b>Vh-n+SBNO (8)</b>	147.5 $\pm$ 6.9	15.9 $\pm$ 0.6	12.8 $\pm$ 0.4	28.6 $\pm$ 0.8
<b>Cap-n+SBNO (6)</b>	137.4 $\pm$ 7.9	16.0 $\pm$ 1.3	14.2 $\pm$ 1.1	30.2 $\pm$ 2.4

( ) Número de animales por grupo.

\*  $p < 0.05$  vs. Vh-n+SNOI, prueba de t-student.

### **Timo y bazo**

La sección unilateral o bilateral del NOS en la rata inyectada al nacimiento con capsaicina no modificó de manera significativa el peso del timo. En las hembras con sección del NOS izquierdo resultó en un incremento en el peso del bazo, comparado con el grupo con vehículo (Tabla 9).

**Tabla 9.** Media  $\pm$  eem del peso (en mg/100 g de peso corporal) del timo y bazo, en animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 28 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.

<b>Grupo</b>	<b>Timo</b>	<b>Bazo</b>
<b>Vh-n+OS (11)</b>	293.3 $\pm$ 11.4	360.6 $\pm$ 37.8
<b>Cap-n+OS (8)</b>	325.3 $\pm$ 14.2	388.9 $\pm$ 25.3
<b>Vh-n+SNOI (10)</b>	302.6 $\pm$ 13.6	348.3 $\pm$ 20.0
<b>Cap-n+SNOI (9)</b>	309.2 $\pm$ 22.5	430.6 $\pm$ 26.1*
<b>Vh-n+SNOD (11)</b>	319.0 $\pm$ 13.4	377.6 $\pm$ 51.8
<b>Cap-n+SNOD (9)</b>	300.7 $\pm$ 10.4	405.9 $\pm$ 39.2
<b>Vh-n+SBNO (8)</b>	310.6 $\pm$ 14.9	368.2 $\pm$ 17.7
<b>Cap-n+SBNO (6)</b>	340.1 $\pm$ 23.6	374.9 $\pm$ 36.0

( ) Número de animales por grupo.

\*  $p < 0.05$  vs. Vh-n+SNOI, prueba de t-student.

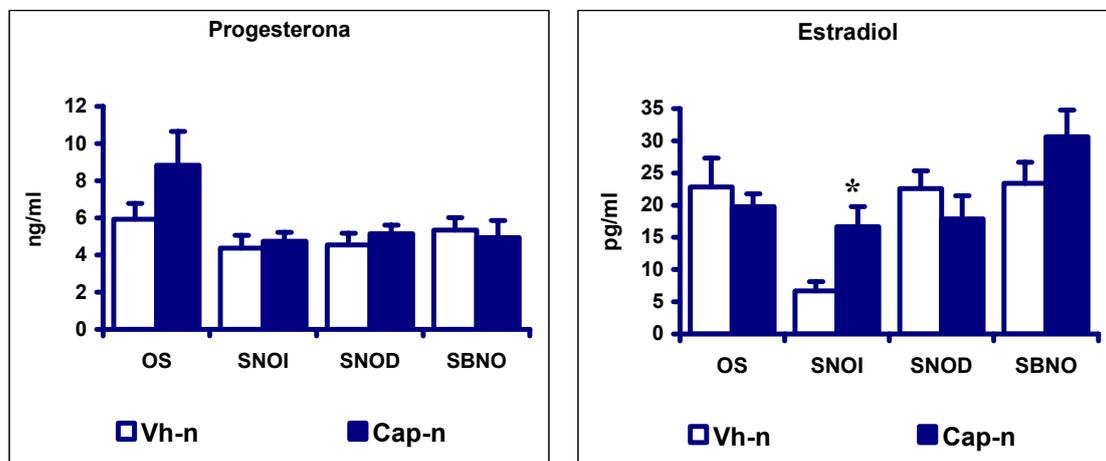
### **Hormonas Esteroides**

En las hembras tratadas al nacimiento con capsaicina la sección unilateral o bilateral del NOS no modificó la concentración de progesterona. En las ratas que fueron sometidas a una operación simulada se observó una mayor concentración de la hormona, que no llegó a ser estadísticamente significativo, respecto al grupo tratado con vehículo (Figura 11A). La sección del NOS izquierdo en las ratas inyectadas con vehículo resultó en una menor concentración de estradiol, si se compara con el grupo tratado con vehículo pero sometido a la operación simulada ( $6.67 \pm 1.47$  vs.  $22.83 \pm 4.48$ ,  $p < 0.05$  prueba de t-student).

En el grupo tratado con capsaicina la sección del NOS izquierdo resultó en una menor concentración de estradiol, comparado con el grupo tratado con vehículo (Figura 11B).

En todos los grupos experimentales la concentración de testosterona estuvo por debajo de la sensibilidad del método.

**Figura 11.** Concentración sérica de hormonas esteroides: progesterona (A) y 17  $\beta$ -estradiol (B) de animales tratados con vehículo (Vh-n) o capsaicina (Cap-n) al nacimiento. A los 28 días de edad fueron sometidos a una operación simulada (OS) o sección del NOS izquierdo (SNOI), derecho (SNOD) o bilateral (SBNO) y sacrificados en el día del primer estro vaginal.



\*  $p < 0.05$  vs. Vh-n+SNOI, prueba de t-student.

## **XII. DISCUSIÓN**

Los resultados obtenidos en el presente estudio nos llevan a sugerir que el inicio de la pubertad es modulado por las hormonas del eje hipotálamo-hipófisis-ovario y por la información sensorial del plexo ovárico y la simpática que llega al ovario por el nervio ovárico superior.

En el presente estudio la sección del nervio ovárico superior realizada al final de la etapa infantil o juvenil no modificó el inicio de la pubertad, resultados semejantes han sido reportados por Aguado y Ojeda (1984b) y Morales y col. (1993) quienes han mostrado que la sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior no modifica el inicio de la pubertad.

Lara y col. (1990b) mostraron que la eliminación de las fibras simpáticas por la administración neonatal de guanetidina resulta en un retraso de la pubertad. Es posible que esto sea el resultado de eliminar las fibras simpáticas que llegan a la glándula suprarrenal y no sólo las que arriban al ovario. En apoyo a esto se ha visto que la extirpación de la médula suprarrenal induce retraso de la pubertad (Aguado y Ojeda, 1984a).

Algunas evidencias muestran que los efectos de la denervación sensorial por administración de capsaicina dependen de la cepa que se utiliza y de la edad a la que se realiza la aplicación del fármaco. Traurig y col. (1984b) inyectaron la capsaicina a ratas un día después de su nacimiento y observaron que la pérdida de fibras sensoriales ocasiona un retraso en la edad de apertura vaginal, lo cual fue explicado en función de una disminución en el peso corporal. Estudios previos de nuestro laboratorio mostraron que dicho retraso no se presenta cuando se administra el agente neurotóxico el día del nacimiento de las ratas, pero sí se observa cuando se administra al día tres de vida (Morán y col., 2003). De acuerdo a estas evidencias experimentales, en la rata la canalización espontánea de la vagina parece ser modulada por la información que transportan las fibras sensoriales, pero su modulación depende de la edad del animal.

Lara y col. (1990a) mostraron que la destrucción de las fibras nerviosas ováricas, por la administración de un anticuerpo para el factor de crecimiento neural (ab-NGF), ocasiona un retraso en el inicio de la pubertad, si bien ellos propusieron que el efecto era ocasionado por la pérdida de las fibras simpáticas, cabe señalar que ante la falta del NGF no solamente mueren las fibras simpáticas sino también un grupo de fibras sensoriales, particularmente de tipo C, sensibles a la capsaicina (Julius y Basbaum, 2001). Por estas

evidencias, es posible sugerir que los mecanismos neuroendocrinos que conllevan a la pubertad son regulados tanto por las fibras simpáticas como por las sensoriales, además de la participación hormonal, donde la información transportada por las fibras sensoriales podría estar modulando la actividad de las fibras nerviosas simpáticas o bien, podrían actuar de forma sinérgica, tal y como ha sido propuesto en un modelo experimental diferente por Simmons (2001) quien señala que la SP, presente en las fibras sensoriales, ejerce un efecto excitatorio sobre las fibras ganglionares simpáticas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el presente estudio, pensamos que existe una regulación bidireccional entre las fibras simpáticas y las sensoriales. En apoyo a esta hipótesis mostramos que en la rata con denervación sensorial, la sección del nervio ovárico superior izquierdo o la bilateral, realizada al final de la etapa infantil, ocasionó retraso en la edad de la canalización vaginal.

El hecho de que en las hembras con denervación sensorial al nacimiento, se modifique el inicio de la pubertad solamente cuando se secciona el NOS izquierdo o ambos nervios, puede ser explicado por la existencia de una asimetría en la función ovárica o en el número de fibras que arriban a la gónada. Así Klein y Burden (1988) señalan que el ovario izquierdo presenta una mayor densidad de fibras que el derecho. Por otra parte, han sido reportadas varias asimetrías en la anatomía de la inervación periférica (Gerendai y col., 1997), por tanto, no podemos descartar que en el caso concreto de la información aferente-eferente al ovario ocurra lo mismo.

Gerendai y Halász (1978) mostraron que en la rata adulta, la simpatectomía inducida por la administración local del agente neurotóxico 6-OHDA en uno de los ovarios, resulta en una respuesta compensadora por parte del ovario intacto, semejante a lo que se presenta en el animal hemicastrado. En nuestro estudio, la sección unilateral del nervio ovárico superior resultó en una ovulación compensadora por parte del ovario inervado, donde además la gónada denervada presentó menor cuota ovulatoria.

En el caso de los animales con sección unilateral del nervio ovárico superior la respuesta ovulatoria se presenta de manera lateralizada y la respuesta compensadora del ovario depende de la integridad de la inervación sensorial. Lo cual nos indica que la inervación sensorial podría tener un papel modulador estimulante sobre la inervación simpática, ya que cuando se realiza la denervación sensorial al nacimiento, por la administración de capsaicina, se pierde el efecto de lateralización en el número de ovocitos liberados, en respuesta a la sección del nervio ovárico superior. Esto podría

indicar que entre las fibras simpáticas y las sensoriales se establece una especie de circuito neural que modula la ovulación.

Previamente se ha mostrado que la sección bilateral del nervio ovárico superior no modifica la concentración sérica de FSH y LH (Aguado y col., 1984b). Es además evidente que en el animal con sección de ambos nervios la respuesta ovulatoria no resulta de la sumatoria de los efectos provocados por la sección del nervio ovárico izquierdo y derecho. Algunos autores han planteado en la hembra con sección bilateral del nervio ovárico, la existencia de otros mecanismos neurales que permiten que la ovulación se presente de manera normal (Aguado y col., 1984; Chávez y col., 1991; Morales y col., 1993, 1998).

En la rata que es sometida a la denervación sensorial al nacimiento y a la sección bilateral del nervio ovárico superior al final de la etapa infantil o juvenil, se observa que disminuye la cuota ovulatoria y la concentración sérica de LH. Esto podría indicar que las fibras sensoriales modulan la secreción de LH. En apoyo a esta interpretación, Cotton y col. (1983), observaron que en la rata adulta que había sido denervada en la etapa neonatal por la administración de capsaicina, los "picos" preovulatorios de LH y FSH presentaron una atenuación.

Otra posible explicación a la disminución del número de ovocitos liberados en los animales con denervación sensorial y simpática es que no existió un microambiente adecuado durante el proceso de crecimiento y diferenciación de los folículos, esto al no existir las vías neurales aferentes y eferentes al SNC, durante el proceso de maduración de los folículos. Por último no podemos descartar que la inervación sensorial tenga una participación directa en los eventos que culminan con la ovulación. Calka y col. (1988) observaron fibras inmunorreactivas a CGRP en estrecha relación con los folículos en desarrollo, de tal modo que la eliminación de las fibras sensoriales podría modificar de manera importante el microambiente alrededor del folículo, y con ello la maduración final del folículo que culmina con la ovulación.

La sección unilateral del nervio ovárico superior se acompaña de disminución en el peso del ovario denervado, esto en parte se podría explicar por la disminución en el número de cuerpos lúteos recién formados o por una menor cantidad de folículos, tal y como ya se ha mostrado que ocurre en la rata prepúber (Morán y col., 2000).

Garraza y col. (2004) encontraron que la NA, la SP, el NPY y el VIP estimulan la síntesis de progesterona por los ovarios en estudio *in vitro*, pero este resultado sólo se obtiene en ovarios que fueron extraídos el día del diestro dos, lo que indica que la

participación de los neuropéptidos en la regulación de la esteroidogénesis depende del ambiente neuroendócrino en el que se encuentre la gónada. Esto podría extrapolarse a los resultados observados en el presente estudio, donde la mayor parte de diferencias se encontraron cuando se realizó la sección de nervio ovárico superior al final de la etapa infantil, no así cuando se efectuó al final de la etapa juvenil.

En las hembras con la inervación sensorial intacta pero con sección bilateral del nervio ovárico superior se observó disminución en la concentración de hormonas esteroides ováricas. Estos resultados confirman los obtenidos previamente (Morán y col., 2000) y apoyan la idea de que la inervación simpática participa de manera estimulante en la modulación de la secreción de las hormonas ováricas (Dissen y Ojeda, 1999; Morán y col., 2000). En los grupos con denervación unilateral la concentración de las hormonas esteroides fue semejante al del grupo testigo, resultados que nos permiten sugerir que el ovario que conservó intacta su inervación presentó un efecto compensador, que permitió la homeostasis.

Las fibras simpáticas estarían modulando la esteroidogénesis vía la activación de los receptores  $\beta_2$ -adrenérgicos (Aguado y col., 1984a y b), y por el aumento en la síntesis de los componentes del complejo enzimático que rompe la cadena lateral del colesterol (Dissen y Ojeda, 1999). Los péptidos que llegan por la inervación simpática también participan en la modulación de la foliculogénesis y el desarrollo folicular, ya que promueven el crecimiento de folículos y la diferenciación bioquímica de los receptores a FSH (Malamed y col., 1992; Mayerhofer, y col., 1997).

La disminución observada en la concentración de estradiol en los grupos tratados con capsaicina, independientemente de si fueron sometidos o no a la sección del nervio ovárico superior al final de la etapa juvenil, puede indicar la posible modulación que ejerce la inervación sensorial sobre la actividad de las fibras simpáticas en el proceso de esteroidogénesis. O bien de la acción directa de las fibras sensoriales sobre las esteroidogénesis, tal y como ha sido propuesto que ocurre en la rata adulta (Trujillo y Riboni, 2002).

El incremento del peso del útero observado en las ratas tratadas con capsaicina y sometidas a sección del nervio ovárico superior derecho no es debido a un aumento en la concentración sérica de estradiol, lo que podría indicarnos que el útero se torna más sensible a los estrógenos circulantes, dado por un incremento en el número o en la afinidad de los receptores a la hormona en el tejido.

Se ha reportado que la sección bilateral del nervio ovárico superior no afecta la concentración sérica de gonadotropinas (Aguado y Ojeda 1984b). En el presente trabajo se observó disminución en la concentración sérica de LH cuando se efectuó la sección bilateral del nervio ovárico superior a ratas de 20 días de edad, que fueron denervadas al nacimiento con capsaicina. La disminución de la concentración de LH podría deberse a la falta de las fibras sensoriales, de lo que resulta que se requiere de ambos tipos de inervación para que la información originada en las gónadas sea correctamente integrada a nivel central.

En el presente estudio se observó que los efectos de la sección del nervio ovárico superior son más drásticos cuando ésta se realiza al final de la etapa infantil. Esto podría ser explicado en función de que aparentemente la participación de las fibras nerviosas que entran al ovario, vía el nervio ovárico superior, depende de la etapa de desarrollo de la rata hembra. En apoyo a esto Chávez y col., (1991) mostraron que en la rata hemicastrada, la respuesta compensadora que se presenta después de la sección del nervio ovárico depende del día del ciclo en el que se realiza la denervación. Por otra parte, D'Albora y col. (2002) mostraron que en la rata Wistar el número de neuronas intrínsecas ováricas (de carácter catecolaminérgico) disminuye conforme avanza la edad.

En el ovario se ha detectado la presencia de terminales nerviosas que son inmunorreactivas tanto a VIP como a PACAP (Dissen y Ojeda, 1999), así como de sus receptores, por lo que se ha propuesto que podrían actuar como reguladores locales en la actividad gonadal (Mayerhofer y col., 1997; Vaudry y col., 2000). Gras y col. (1999) observaron que el PACAP es un estimulador parácrino de la acumulación de progesterona y posterior luteinización de células de la granulosa. La expresión del PACAP en células esteroideogénicas ováricas es transitoria y esta confinada al periodo periovulatorio en células de la granulosa de folículos preovulatorios, en células de la teca de folículos maduros e inmaduros y en la glándula intersticial (Gras y col., 1999). Estas evidencias experimentales concuerdan con nuestros resultados, donde observamos que la participación de la inervación está en función del ambiente neuroendócrino del animal.

Con los resultados del presente estudio apoyamos nuestra hipótesis de que a nivel del ovario, existe una relación bidireccional entre la información que transcurre por las fibras simpáticas y las sensoriales, éstas últimas sensibles a la capsaicina.

Estudios previos apoyan esta propuesta a nivel de varios tejidos. Tal es el caso del realizado por Simmons (2001) quien observó que la SP, liberada por fibras sensoriales, ejerce un efecto excitatorio sobre las neuronas del ganglio simpático. Hasan y Smith

(2000), observaron que la actividad secretora de las fibras parasimpáticas del ganglio pterigopalatino es influenciada por las fibras simpáticas del ganglio cervical superior. Las fibras simpáticas liberan noradrenalina que se une a un receptor en las fibras parasimpáticas, lo que estimularía la síntesis del ARNm y la posterior producción de NGF. Este último, se une al receptor trkA presente en las fibras simpáticas, con lo que se refuerzan las asociaciones axo-axonales entre las fibras autónomas. Es posible que a nivel del ovario se presente este tipo de relación funcional entre las fibras simpáticas, contenidas en el nervio ovárico superior y las fibras sensoriales sensibles a la capsaicina.

Algunos estudios electrofisiológicos también apoyan la idea de una relación funcional entre las fibras simpáticas y las sensoriales. Stener-Victorin y col. (2000) mostraron que en ratas con ovario poliquístico, la estimulación eléctrica de las fibras sensoriales de tipo A $\delta$  y posiblemente también las de tipo C, disminuye la actividad eléctrica de las fibras simpáticas.

Por otra parte, se ha reportado que la pérdida de fibras sensoriales o parasimpáticas ocasiona un incremento en la densidad de fibras simpáticas en la región denervada, y a la inversa, la pérdida de la inervación simpática ocasiona un incremento de fibras sensoriales o parasimpáticas. Ralevic y col. (1995) mostraron que la denervación sensorial con capsaicina ocasiona una hiperinervación simpática en la arteria mesentérica. Este comportamiento también se ha observado en el iris del ojo (Luthman y col., 1989) y en el tejido parametrial del útero (Brauer y col., 1994). Se ha propuesto que la causa del incremento en la densidad de un tipo de fibras, posterior a una denervación, es ocasionado por un cambio en el microambiente que rodea a las fibras nerviosas remanentes o bien, a que hay una mayor disponibilidad de NGF para las fibras que no han sido destruidas (Hasan y Smith, 2000).

Nuestros resultados nos permiten sugerir que la inervación simpática regula de manera estimulante la ovulación y la secreción de hormonas esteroides. Donde las fibras de naturaleza sensorial estarían modulando de una manera "fina" la acción de la inervación simpática sobre el folículo ovárico. No descartamos que la información sensorial que llega al ovario actúe directamente sobre el folículo ovárico, específicamente sobre las células de la teca.

Finalmente, las fibras sensoriales serían las encargadas de "recoger" la información a nivel del ovario y de llevarla a los centros superiores donde se procesa y produce una respuesta, la cual sería enviada a las gónadas vía el nervio ovárico superior.

### **XIII. CONCLUSIONES**

- En la rata con sección unilateral o bilateral del nervio ovárico superior, el inicio de la pubertad depende de la edad en la que se realiza la cirugía y de la integridad de la inervación sensorial.
- El efecto compensador observado en las hembras con sección unilateral del nervio ovárico superior depende de la integridad de la inervación sensorial.
- Es posible que el proceso ovulatorio resulte de la integración de la información proveniente de las fibras simpáticas y las sensoriales, estableciendo así un circuito neural que regula la ovulación.
- La regulación de la secreción de LH depende de la integridad de las fibras simpáticas y sensoriales.
- La modulación estimulante que ejercen las fibras simpáticas, que provienen del nervio ovárico superior, podría ser regulada por las fibras de naturaleza sensorial.

#### XIV. BIBLIOGRAFIA

- Aguado LI y Ojeda SR (1984a). Effect of selective removal of the adrenal medulla on female sexual development. *Biology of Reproduction*, **31**: 605-618.
- Aguado LI y Ojeda SR (1984b). Prepuberal ovarian function is finely regulated by direct adrenergic influences. Role of noradrenergic innervation. *Endocrinology*, **114 (5)**:1845-1853.
- Aguado LI y Ojeda SR (1984c). Ovarian adrenergic nerves play a role in maintaining preovulatory steroid secretion. *Endocrinology*, **114 (5)**: 1944-1946.
- Anesetti G, Lombide P, D'Albora H y Ojeda SR (2001). Intrinsic neurons in the human ovary. *Cell and Tissue Research*, **306**: 231-237.
- Apolonio J (2001). Participación de la inervación sensorial sobre el inicio de la pubertad en la rata hemicastrada. Tesis de licenciatura, no publicada. F.E.S. Zaragoza, UNAM.
- Bailey TW, Jin YH, Doyle MW y Andresen MC (2002). Vanilloid-sensitive afferents active neurons with prominent A-Type potassium currents in nucleus tractus solitarius. *The Journal of Neuroscience*, **22 (18)**: 8230-8237.
- Barria A, Leyton V, Ojeda SR y Lara HE (1993). Ovarian steroidal response to gonadotropins and  $\beta$ -adrenergic stimulation is enhanced in polycystic ovary syndrome: role of sympathetic innervation. *Endocrinology*, **133 (6)**: 2696-2703.
- Becu-Villalobos D y Lacau Mengido IM (1990). Control hormonal del desarrollo puberal en la rata hembra. *Acta Physiologica y Pharmacologica Latinoamericana*, **40**: 1-17.
- Ben-Jonathan N, Arbogast LA, Rhoades TA y Bahr JM (1984). Norepinephrine in the rat ovary: ontogeny and de novo synthesis. *Endocrinology*, **115**: 1426-1431.
- Brauer MM, Lincoln J, Milner P, Sarnier S, Blundell D, Passaro M, Corbacho A y Burnstock G (1994). Plasticity of autonomic nerves: differential effects of long-term guanethidine sympathectomy on the sensory innervation of the rat uterus during maturation. *International Journal of Developmental Neuroscience*, **12 (6)**: 579-86.
- Burden HW y Lawrence JR (1977). The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. *Neuroendocrinology*, **23**: 368
- Burden HW, Lawrence JR, Louis TM y Hodson CA (1981). Effects of abdominal vagotomy on the estrus cycle of the rat and the induction of pseudopregnancy. *Neuroendocrinology*, **33**: 218-222.

- Burden HW, Leonard M, Smith CP y Lawrence IE (1983). The sensory innervation of the ovary: a horseradish peroxidase study in the rat. ***The Anatomical Record*, 207: 623-627.**
- Burks TF, Buck SH y Miller MS (1985). Mechanisms of depletion of substance P by capsaicin. ***Federation Proceedings*, 44 (9): 2531-2534.**
- Calka J, Mc Donald J K, Ojeda S R (1988). The innervation of immature rat ovary by calcitonin gene related peptide. ***Biology of Reproduction*, 39: 1215-1223.**
- Caterina MJ, Rosen TA Tominaga M Brake AJ y Julius D (1999). A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. ***Nature*, 398: 436-441.**
- Caterina MJ, Schumacher MA, Tominaga M, Rosen TA, Levine JD y Julius D (1997). The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. ***Nature*, 389: 816-824.**
- Carrillo P, Mánzo J, Martínez-Gómez M, Salas M y Pacheco P (1994). Neonatal capsaicin administration: effects on behavioral development of rat. ***Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 48 (2): 447-452.**
- Chávez R, Carrizosa L, Domínguez R (1991). Effects of superior ovarian nerve section on spontaneous and induced ovulation in adult rat. ***Medical Science Research*, 19: 41-42.**
- Chávez R, Cruz ME y Domínguez R (1987). Differences in the ovulation rate of the right or left ovary in unilaterally ovariectomized rats: effect of ipsi- and contralateral vagus nerves on remaining ovary. ***Journal of Endocrinology*, 113: 397-401.**
- Clapham DE (1997). Some like it hot: spicing up ion channels. ***Nature*, 389: 783-784.**
- Cook SP, Vulchanova L, Hargreaves KM, Elde R y McCleskey EW (1997). Distinct ATP receptors on pain-sensing and stretch-sensing neurons. ***Nature*, 387: 505-508.**
- Cotton J, Traurig H y Papka R (1983). Substance P and vasoactive intestinal polypeptide-immunoreactive nerves in the female reproductive system. ***Anatomical Records*, 205: 38A-39A.**
- D'Albora H, Anesetti G, Lombide P, Dees LW y Ojeda SR (2002). Intrinsic neurons in the mammalian ovary. ***Microscopy Research and Technique*, 59: 484-489.**
- D'Albora H, Lombide P y Ojeda SR (2000). Intrinsic neurons in the rat ovary: an immunohistochemical study. ***Cell and Tissue Research*, 300: 47-56.**
- Dees WL, Hiney CE, Schultea TD, Mayerhofer A, DanilchikM, Dissen GA y Ojeda SR (1995). The primate ovary contains a population of catecholaminergic neuron-like cells expressing nerve growth factor receptors. ***Endocrinology*, 136: 5760-5768.**

- Di Marzo V, Blumberg PM y Szallasi A (2002). Endovanilloid signaling in pain. ***Current Opinion in Neurobiology*, 12: 372-379.**
- Dissen GA, Hill DF, Costa ME, Dees WL, Lara H y Ojeda SR (1996). A role for trkA nerve growth factor receptors in mammalian ovulation. ***Endocrinology*, 137 (1):198-209.**
- Dissen G, Ojeda S (1999). Ovarian innervation. En: Knobil E y Neill J (eds.) *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press, USA. **Vol. 3, pp 583-589.**
- Dissen GA, Romero C, Hirshfield AN y Ojeda SR (2001). Nerve growth factor is required for early follicular development in the mammalian ovary. ***Endocrinology*, 142 (5): 2078-2086.**
- Dissen GA, Romero C, Paredes A y Ojeda SR (2002). Neurotrophic Control of Ovarian Development. ***Microscopy Research And Technique*, 59: 509–515.**
- Domínguez R, Cruz ME y Chávez R (1989). Differences in the ovulatory between the right and left ovary are related to ovarian innervation. En Hirshfield AM (ed.) *Growth Factors and the ovary*, Plenum Press, New York. **pp 321-325.**
- Duchen MR (2000). Mitochondria and calcium: from cell signalling to cell death. ***Journal of Physiology*, 529 (1): 57—68**
- Erskine M S y Weaver Ch E (1988). The role of ovarian sympathetic innervation in the control of estrus responsiveness in the rat. ***Hormones and Behavior*, 22: 1-11.**
- Espey LL (1999). Ovulation. En: Knobil E y Neill J (eds.) *Encyclopedia of Reproduction*, Academic Press, USA. **Vol. 3, pp 605-614.**
- Flores A, Ayala M E, Domínguez R (1990). Does noradrenergic peripheral innervation have a different role in the regulation ovulation in the pubertal and the adult rat? ***Medical Science Research*, 18: 817-818.**
- Forneris ML y Aguado LI (2002). Neonatal superior ovarian nerve transection disturbs the cyclic activity of the female rats. ***Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 82: 75-82.**
- Garraza MH, Aguado LI, De Bortoli MA (2004). *In vitro* effect of neuropeptides on ovary or celiac ganglion affects the release of progesterone from ovaries in the rat. ***Medical Science Monitor*, 10 (12): BR440-BR446.**
- Gasque G y Félix R (2000). Tras la pista de la percepción al dolor: estructura y función de los receptores purinérgicos y de vaniloide. ***Avance y Perspectiva*, 19: 339-345.**
- Gerendai I y Halász B (1978). Neural participation in ovarian control. ***Trends in Neurosciences*, 1(1): 87-88.**

- Gerendai I y Halász B (1997). Neuroendocrine asymmetry. *Frontiers in Neuroendocrinology*, **18**: 354-381.
- Gerendai I y Halász B (2001). Asymmetry of the neuroendocrine system. *News in Physiological Sciences*, **16** (2): 92-95
- Gerendai I, Csaba Z, Voko Z y Halász B (1995). Involvement of a direct neural mechanism in the control of gonadal functions. *Journal of Steroid and Biochemistry Molecular Biology*, **53** (1-6): 299-305.
- Gerendai I, Tóth IE, Boldogkoi Z, Medveczky I y Halász B (2000). CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. *Journal of Autonomic Nervous System*, **80**: 40-45.
- Goldman JM, Parrish MB, Cooper RL y McElroy WK (1997). Blockade of ovulation in the rat by systemic and ovarian intrabursal administration of the fungicide sodium dimethyldithiocarbamate. *Reproductive Toxicology*, **11**(2-3): 185-190.
- Gras S, Hannibal J y Fahrenkrug J (1999). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide is an auto/paracrine stimulator of acute progesterone accumulation and subsequent luteinization in cultured periovulatory granulosa/lutein cells. *Endocrinology*, **140** (5): 2199-2205.
- Green DR y Reed JC (1998). Mitochondria and apoptosis. *Science*, **281**: 1309-1312.
- Greenstein BD (1992). Effects of  $\alpha$ -fetoprotein administration on estradiol free fraction, the onset of puberty, and neural and uterine nuclear estrogen receptors. *Endocrinology*, **130** (6): 3184-3190.
- Greenwald GS y Roy SK (1994). Follicular development and its control. En: Knobil E y Neil JD (eds.) *The Physiology of Reproduction*. Raven Press, Ltd., New York, 2ª ed. pp 629-724.
- Hasan W y Smith PG (2000). Nerve growth factor expression in parasympathetic neurons: regulation by sympathetic innervation. *European Journal of Neuroscience*, **12**: 4391-4397.
- Holzer P (1991). Capsaicin: cellular targets, mechanism of action, and selectivity for sensory neurons. *Pharmacological Reviews*, **43** (2): 143-201.
- Iversen S, Iversen L y Saper C B (2001). Sistema nervioso autónomo e hipotálamo. En: Kandel E R, Schwartz J H y Jessell T M (eds.) *Principios de neurociencia*, Mc Graw-Hill/Interamericana de España, S A U, España, pp. 960-982.
- Julius D y Basbaum A I (2001). Molecular mechanisms of nociception. *Nature*, **413**: 203-210.

- Kirschstein T, Greffrath W, Busselberg D, Treede RD (1999). Inhibition of rapid heat responses in nociceptive primary sensory neurons of rats by vanilloid receptor antagonists. ***Journal of Neurophysiology*, 82 (6): 2853-2860.**
- Klein CM y Burden HW (1988). Anatomical localization of afferent and postganglionic sympathetic neurons innervating the rat ovary. ***Neuroscience Letters*, 85: 217-222.**
- Kress M y Zeilhofer U (1999). Capsaicin, protons and heat: new excitement about nociceptors. ***Trends in Pharmacological Sciences*, 20 (3): 112-118.**
- Lara H E, McDonald J K, Ahmed C E y Ojeda S R (1990a). Involvement of nerve growth factor in female sexual development. ***Endocrinology*, 126(1): 364-374.**
- Lara HE, McDonald J K, Ahmed C E, Ojeda S R (1990b). Guanethidine-mediated destruction of ovarian sympathetic nerves disrupts ovarian development and function in rats. ***Endocrinology*, 127: 2199-2209.**
- Lara HE, Dorfman M, Venegas M, Luza SM, Luna SL, Mayerhofer A, Guimaraes MA, Rosa E Silva AAM Y Ramirez VD (2002). Changes in sympathetic nerve activity of the mammalian ovary during a normal estrous cycle and in polycystic ovary syndrome: studies on norepinephrine release. ***Microscopy Research And Technique*, 59: 495-502.**
- Lara HE, Ferruz J, Luza S, Bustamante DA, Borges Y y Ojeda SR (1993). Activation of ovarian sympathetic nerves in polycystic ovary syndrome. ***Endocrinology*, 133(8): 2690-2695.**
- Lawrence I y Burden H (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. ***The Anatomical Record*, 196: 51-59.**
- Lawrence I, Burden H y Louis TM (1978). Effect of abdominal vagotomy of the pregnant rat on LH and progesterone concentrations and fetal resorption. ***Journal of Reproduction and Fertility*, 33: 131-136.**
- Luthman J, Stromberg I, Brodin E y Jonsson G (1989). Capsaicin treatment to developing rats induces increase of noradrenaline levels in the iris without affecting the adrenergic terminal density. ***International Journal of Developmental Neuroscience*, 7(6): 613-22.**
- Malamed S, Gibney J A, Ojeda S R (1992). Ovarian innervation develops before initiation of folliculogenesis in the rat. ***Cell Tissue Research*, 270: 87-93.**
- Mayerhofer A, Dissen GA, Costa ME y Ojeda SR (1997). A role for neurotransmitters in early follicular development: induction of functional follicle-stimulating hormone

receptors in newly formed follicles of the rat ovary. *Endocrinology*, **138(8): 3320-3329.**

Mayerhofer A, Dissen GA, Parrot JA, Hill DF, Mayerhofer D, Garfield RE, Costa ME, Skinner MK y Ojeda SR (1996). Involvement of nerve growth factor in the ovulatory cascade: trkA receptor activation inhibits gap junctional communication between thecal cells. *Endocrinology*, **137(12): 5662-5670.**

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 M E, Domínguez R (1998). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in prepubertal rats on the ovulatory response to gonadotrophin administration. *Journal of Endocrinology*, **158: 213-219.**

Morales L, Betanzos R y 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, Razo S, Morales L y Domínguez R (2000a). Efectos de la denervación sensorial sobre la pubertad. XXV Reunión de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Celebrado en Taxco, Gro., México. **pp. 157-161.**

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

Morán C, Morales L, Chavira R, Domínguez R (2001). Efectos de la denervación sensorial inducida por la administración de capsaicina al nacimiento, sobre la esteroidogénesis y el desarrollo folicular durante la etapa juvenil en la rata. XXVI Reunión de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción. Celebrado en Acapulco, Gro., México. **pp. 234-245.**

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: 2113-2125.**

Nagy I y Rang H (1999). Noxious heat activates all capsaicin-sensitive and also a sub-population of capsaicin-insensitive dorsal root ganglion. *Neuroscience*, **88(4): 995-997.**

- Nance DM, King TR y Nance PW (1987). Neuroendocrine and behavioral effects of intratecal capsaicin in adult female rats. ***Brain Research Bulletin*, 18: 109-114.**
- Ojeda SR (1997). Control neuroendocrinotrófico del desarrollo de la función ovárica. XV Reunión de la Asociación Latinoamericana de Investigadores en Reproducción Humana. Celebrado en Cusco, Perú, **pp 13-14.**
- Ojeda SR, Andrews WW, Advis JP y Smith White S (1980). Recent advances in the endocrinology of puberty. ***Endocrine Reviews*, 1: 228-257.**
- Ojeda SR y Urbanski HF, (1994). Puberty in the rat. En: Knobil E y Neil JD (eds.) *The Physiology of Reproduction*, Raven Press, Ltd, New York, 2ª ed., **vol. 2, pp. 363-409.**
- Quiróz U, Morales L, Morán C y Domínguez R (1999). Effects of sympathetic denervation induced by guanethidine administration to pregnant rats on follicular development and puberty of the offspring. ***Medical Science and Research*, 27: 599-600.**
- Ralevic V, Karoon P y Burnstock (1995). Long-term sensory denervation by neonatal capsaicin treatment augments sympathetic neurotransmission in rat mesenteric arteries by increasing levels of norepinephrine and selectively enhancing postjunctional actions. ***Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 274: 64-71.**
- Raynaud JP (1973). Influence of rat estradiol binding plasma protein (EBP) on uterotrophic activity. ***Steroids*, 21: 249-258.**
- Razo S (2000). Participación de la inervación sensorial en el proceso de foliculogénesis. La rata púber como modelo de estudio. Tesis de licenciatura, F.E.S. Zaragoza, UNAM.
- Richards JS, Russell DL, Ochsner S y Espey LL (2002). Ovulation: New dimensions and new regulators of the inflammatory-like response. ***Annual Reviews of Physiology*, 64: 69-92.**
- Rodriguez-Sierra JF, Skofitsch G, Komisaruk BR y Jakobowitz DM (1988). Abolition of vagino-cervical stimulation-induced analgesia by capsaicin administered to neonatal, but not adult rats. ***Physiology and Behavior*, 44: 267-272.**
- Romero C, Paredes A, Dissen GA y Ojeda SR (2002). Nerve growth factor induces the expression of functional FSH receptors in newly formed follicles of the rat ovary. ***Endocrinology*, 143(4): 1485-1494.**
- Rosa-e-Silva A, Guimaraes MA, Padmnabhan V y Lara HE (2003). Prepubertal administration of estradiol valerate disrupts cyclicity and leads to cystic ovarian

morphology during adult life in the rat: role of sympathetic innervation. ***Endocrinology*, 144(10): 4289–4297.**

Rosa-e-Silva A, Prajante TM, Almeida FHS, Guimaraes MA y Lunardi LO (1997). Ovarian granulosa and theca interstitial cells: a morphological and physiological analysis in guanethidine denervated rats at pre-puberty. ***Cellular and Molecular Biology*, 43 (3): 409-416.**

Salas M, Torrero C, Pulido S, Pérez H (1991). Acciones neurotrópicas de las hormonas tiroideas durante la ontogenia neuronal. En: Salas M (ed.) *Ontogenia Neuronal. Aspectos Comparativos y Mecanismos de Regulación*, México: Sociedad Mexicana de Ciencias Fisiológicas, Universidad Nacional Autónoma de México, Coordinación de Investigación Científica. **pp. 177-198.**

Schmidt R, Schmelz M, Forster C, Ringkamp M, Torebjörk E y Handwerker H (1995). Novel classes of responsive and unresponsive c nociceptors in human skin. ***The Journal of Neuroscience*, 15 (1): 333-341.**

Selstam G, Norvajaara E, Tegenfelt T, Lundberg S, Sandstrom C, Persson S (1985). Partial denervation of the ovaries by transection of the suspensory ligament does not inhibit ovulation in rats treated with pregnant mare serum gonadotropin. ***Anatomical Record*, 213: 392-395.**

Shin CY, Shin J, Kim BM, Wang MH, Jang JH, Surh YJ y Oh H (2003). Essential role of mitochondrial permeability transition in vanilloid receptor 1-dependent cell death of sensory neurons. ***Molecular and cellular Neuroscience*, 24: 57-68.**

Simmons MA (2001). Changes of the responses of single sympathetic ganglionic neurones to substance P following desensitization. ***Journal of Autonomic Pharmacology*, 21: 101-112.**

Snider WD y McMahon SB (1998). Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. ***Neuron*, 20: 629-632.**

Sokka T y Huhtaniemi I (1990). Ontogeny of gonadotropin receptors and gonadotropin-stimulated cyclic AMP production in the neonatal ovary. ***Journal of Endocrinology*, 127: 297-330.**

Stener-Victorin E, Lundeberg T, Waldenstrom U, Manni L Aloe L Gunnarsson S y Janson PO (2000). Effects of electro-acupuncture on nerve growth factor and ovarian morphology in rats with experimentally induced polycystic ovaries. ***Biology of Reproduction*, 63(5): 1497-503.**

- Swanson LW y Sawchenko PE (1980). Paraventricular nucleus: A site for the integration of neuroendocrine and autonomic mechanisms. *Euroendocrinology*, **31**: 410-417.
- Szallasi A y Blumberg PM (1996). Vanilloid receptors: new insights enhance potential as a therapeutic target. *Pain*, **68**: 195-208.
- Szoke E, Seress L y Szolcsanyi (2002). Neonatal capsaicin treatment results in prolonged mitochondrial damage and delayed cell death of B cells in the rat trigeminal ganglia. *Neuroscience*. **113 (4)**: 925-37.
- Traurig H, Saria A y Lembeck F (1984a). Substance P in primary afferent neurons of the female rat reproductive system. *Archives of Pharmacology*, **326**: 343-346.
- Traurig H, Saria A, Lembeck F (1984b). The effects of neonatal capsaicin treatment on growth and subsequent reproductive function in the rat. *Archives of Pharmacology*, **327**: 254-259.
- Trujillo A y Riboni L (2002). Effects of functional peripheral sympathetic denervation induced by guanethidine on follicular development and ovulation of the adult female guinea pig. *General and Comparative Endocrinology*, **27(3)**: 273-278.
- Vaudry D, González BJ, Basille M, YON L, Fournier A y Vaudry H (2000). Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide and its receptors: from structure to functions. *Pharmacological Reviews*, **52 (2)**: 269-324.
- Wylie SN, Roche PJ y Gibson WR (1985). Ovulation after sympathetic denervation of the rat ovary produced by freezing its nerve supply. *Journal of Reproduction and Fertility*, **75**: 369-373.
- Yen J y Adashi EY (2001). El ciclo ovárico. En: Yen SSC, Jaffe RB y Barbieri RL (eds.) *Endocrinología de la reproducción*, Panamericana, Argentina, 4ª ed., pp. 164-202.