BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

LA ACETIL L-CARNITINA INDUCE PLASTICIDAD NEURONAL EN EL HIPOCAMPO DE RATAS HEMBRAS PÚBERES DESNERVADAS SENSORIALMENTE. POSIBLE ROL DEL HIPOCAMPO EN LA REGULACIÓN DE LA REPRODUCCIÓN.

PRESENTA:

ESTRELLA DEL MAR CASTILLO LÓPEZ

TESIS PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

LICENCIATURA EN BIOLOGIA

DIRECTOR DE TESIS:

M. en C. UBALDO QUIRÓZ LÓPEZ

ASESORES DE TESIS:

DR. GONZALO FLORES ÁLVAREZ
DRA. ROSALINA REYES LUNA

MARZO, 2020.

“Esta investigación fue realizada gracias al apoyo del Consejo de Ciencia y Tecnología del Estado de Puebla”.

AGRADECIMIENTO

A mi director de tesis, el M. en C. Ubaldo Quiróz López gracias por su confianza y el cariño que le tiene a sus alumnos, por alentarnos día a día. Usted es un ejemplo de Investigador a seguir, gracias profe por su apoyo incondicional, por sus palabras de aliento, por permitirme trabajar a su lado, sus conocimientos y su amistad.

Al Dr. Gonzalo Flores Álvarez por permitirme trabajar con usted, por todo el apoyo brindado en su laboratorio y proporcionarme los elementos necesarios para la elaboración de esta tesis.

A la Dra. Rosalina Reyes Luna por su asesoramiento y aportación de información para la culminación de esta tesis.

A cada uno de mis maestros a lo largo de la licenciatura, gracias por sus invaluables conocimientos y su amistad.

A mis amigos de la universidad y laboratorio: Leo, Jorge, Nancy Belem, Germán, Fernanda, Fátima, Claudia. Gracias por su apoyo, por tantas horas de alegría, por cada una de las experiencias, por sus consejos y por qué sin ustedes mi vida no sería igual.

A las familias: Ramírez Barbosa, Ramírez Miranda y Ramos Aguilar, gracias por hacerme sentir parte de su familia, por su amor, apoyo, oraciones y por escucharme, por celebrar conmigo mis triunfos pero también ser mi sostén en tiempos difíciles.

I N D I C E

Resumen 7
1. **Introducción** 8
1.1 Aparato reproductor femenino 8
1.1.1 Ovarios 9
1.2.2 Hormonas 10
1.2.3 Folículo ovárico 10
1.2.4 Ovulación 11
1.2 Inervación ovárica 13
1.3 Vías neurales entre los ovarios y el SNC 15
1.4 Hipocampo 17
1.4.1 Neuronas piramidales del hipocampo 18
1.4.2 Conexiones neuronales 19
1.5 Modelo de desnervación sensorial 20
1.5.1 Capsaicina 20
1.5.2 Mecanismo de acción 20
1.6 Efectos de la acetil l-carnitina 22
1.6.1 Mecanismo de acción 23
2. Antecedentes 25
3. **Justificación** 30
5. **Hipótesis** 31
4. **Objetivos** 31
4.1 Objetivo general 31
4.2 Objetivos particulares 31
6. **Material y métodos** 32
6.1 Preparación de fármacos 32
6.2 Obtención de muestras 32
6.3 Tinción de Golgi-Cox 33
6.4 Impregnación con solución Golgi-Cox 33
6.5 Dibujo y análisis morfológico de las neuronas 34
6.6 Análisis histológico de ovarios 36
6.7 Análisis del crecimiento folicular 37
6.8 Análisis estadísticos 38

7. **Resultados** 39
7.1 Parámetros de pubertad 40
7.2 Crecimiento folicular 41
7.3 Hipocampo región CA1 46
7.4 Hipocampo región CA3 49
7.5 Longitud dendrítica por lateralidad de la región CA1 y CA3 52
8. **Discusión** 54
9. **Conclusiones** 60
10. **Perspectivas** 61
11. **Anexos** 62
12. **Referencias** 63

RESUMEN

Las funciones del ovario, son regulados por el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, aunado a este control neuroendocrino se ha identificado una vía neural directa entre el sistema nervioso central y las gónadas, cuya función es una regulación fina de los procesos reproductivos. La inervación que reciben las gónadas está constituida por fibras simpáticas, parasimpáticas y entre ellas fibras sensoriales que se encargan de enviar información de estímulos nociceptivos de la periferia hacia el sistema nervioso central. La administración de capsaicina al nacimiento provoca la destrucción irreversible de las fibras sensoriales que presentan el receptor TRPV1. La infertilidad puede estar relacionado con la pérdida de la inervación sensorial.

El presente trabajo tuvo como objetivo analizar los efectos estimulatorios de la acetil l-carnitina en la plasticidad neuronal y la fertilidad, activando sistemas de neurotransmisión como el colinérgico y glutamatérgico. Por ello nos resulta importante conocer sus efectos en la rata desnervada sensorialmente la cual representa un modelo de estudio, permitiendo evaluar la participación de las fibras nerviosas sensoriales en los procesos de reproducción.

La administración de ALCAR mostró un adelanto significativo en la edad de la apertura vaginal y un mayor porcentaje de folículos sanos en los animales denervados con CAPS y tratados con ALCAR, comparado con los grupos CAPS+VH y VH+ALCAR. La administración de ALCAR en los animales previamente denervados aumento la longitud dendrítica, arborización y longitud dendrítica por número de orden de las neuronas de la región CA1 del hipocampo en comparación con los otros dos grupos, no se observaron cambios estadísticamente significativos en las neuronas de la región CA3.

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que en la rata la información sensorial participa de manera estimulatoria los parámetros de pubertad y en la plasticidad neuronal.

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción en mamíferos es una función dependiente de la interacción de hormonas y señales nerviosas, principalmente se acepta que la regulación de procesos reproductivos depende de factores neuroendocrinos que involucra al eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, aunado a este control neuroendocrino se ha identificado una vía neural directa entre el sistema nervioso central y las gónadas, cuya función es una regulación fina de las funciones gonadales (Gerendai, Banczerowski y Halasz, 2005). La inervación que reciben las gónadas está constituida por diferentes fibras entre ellas fibras sensoriales que se encargan de enviar información de estímulos nociceptivos de la periferia hacia el sistema nervioso central conocida como vía aferente. En trabajos previos realizados en el laboratorio observamos que al provocar una desnervación sensorial mediante la administración de capsaicina genera alteraciones en la espermatogénesis de la rata macho, además de alteraciones dendríticas en neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo (Hernández, 2014). Estos datos sugieren la posibilidad de que ciertos problemas de fertilidad estén relacionados con alteraciones en la comunicación sensorial que existe entre las gónadas y diversas estructuras del SNC. Por lo cual se han investigado fármacos que puedan revertir los efectos provocados por la desnervación quirúrgica o farmacológica y restablecer la comunicación neural. Uno de estos fármacos es la acetil l-carnitina generando resultados alentadores para la reinervación. Sin embargo no se han realizado estudios sobre los efectos de la acetil l-carnitina sobre la desnervación sensorial inducida mediante la administración de capsaicina en ratas hembras.

1.1 APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

Todo el aparato reproductivo femenino, excepto la vulva, se sitúa en la cavidad pélvica abdominal y se encuentra sujeto por los ligamentos del peritoneo (membrana que reviste la cavidad abdominal). Una vez alcanzada la pubertad, las principales funciones

del aparato reproductor femenino son generar óvulos, producir hormonas sexuales y llevar a término la gestación y el parto. (Caravaca *et al*., 2008).

El aparato reproductor de la rata hembra está compuesto por ovarios, los oviductos, útero, el cuello uterino y la vagina; es inmaduro al nacer y se convierte en una unidad reproductiva completamente funcional a los 42 días de vida postnatal. El útero se encuentra en la parte posterior de la cavidad abdominal y se conecta con la vagina por un anillo muscular denominado cuello del útero, inmediatamente debajo de la vejiga (Figura 1). Sobre la parte ventral de la vagina reposa el clítoris; la apertura vaginal se encuentra limitada por los labios vulvares. (Quezada, 1997; Picut, y Remick, 2016).

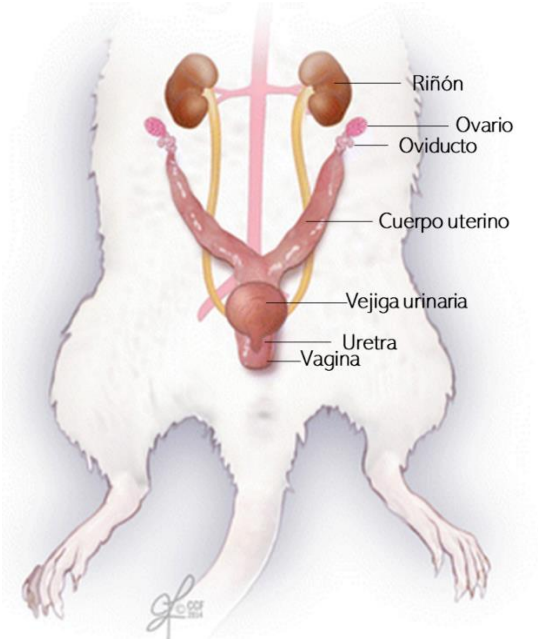

Fig. 1. Representación del aparato genital de una rata hembra (Modificado de Kwiecien, 2015).

1.1.1 Ovarios

Los ovarios son órganos pares, yacen contra la pared pélvica en ambos lados en la parte superior de la misma. Cada ovario está fijado a la superficie posterior del ligamento ancho del útero por un pliegue peritoneal llamado mesovario y a la pared pélvica por el ligamento suspensorio, lugar por donde transitan los vasos y nervios ováricos. (Ross y Pawlina, 2007).

Todo el ovario está recubierto por un epitelio liso de células cubicas que le da un aspecto brillante. Está constituido por una porción externa o corteza y una interna o médula. En la primera de ellas se distingue un estroma inespecífico (tejido conjuntivo) y el denominado aparato folicular (folículos) (Matorras, Hernández y Molero, 2008)

La interna o médula está situada en el centro del ovario y contiene tejido conjuntivo laxo, un conjunto de vasos sanguíneos, vasos linfáticos y nervios (Ross y Pawlina, 2007). Las gónadas son de los órganos más vascularizados gracias a la arteria ovárica y a la arteria uterina; las ramas de la arteria ovárica entran al ovario a través del hilio (Yao y Bahr, 1999).

1.2.2 Hormonas

Las hormonas foliculoestimulante (FSH) y luteinizante (LH) son glicoproteínas producidas y liberadas por la hipófisis anterior, de donde se vierten al torrente sanguíneo para así alcanzar sus órganos blanco, las gónadas. Ambas hormonas, favorecen la maduración gonadal y la esteroidogénesis, capacitando al organismo para que se pueda reproducir (Gómez y Paniagua, 2002). En el caso de la FSH, ésta estimula el crecimiento y desarrollo del folículo hasta la fase preovulatoria, mientras que la LH actúa como un “gatillo” de la ovulación (liberación del ovocito secundario) y estimula a las células foliculares y el cuerpo lúteo para que produzcan progesterona. (Sairam, 1999; Moore, Persaud y Torchia, 2008).

1.2.3 Folículo ovárico

El folículo ovárico es una estructura conformada por un ovocito que se desarrolla y alcanzan la madurez ovulatoria dentro de los folículos (Palma, 2008) y células derivadas del epitelio ovárico llamadas células foliculares o de la granulosa, el folículo se caracteriza por poseer 2 funciones principales: La producción de hormonas y ovocitos aptos para ser fecundados. Estas funciones son llevadas a cabo por los folículos antrales, los cuales poseen una pared interna de células de la granulosa delimitadas por una lámina basal, que separa las células granulosas de los tejidos de origen mesenquimatoso y que afecta la migración celular, la proliferación y la

diferenciación de las células que se encuentran junto a ella. Dependiendo de su estado de desarrollo, puede tener otros componentes, tales como: zona pelúcida, antro y tecas (Rodríguez, 2005; Filipiak, Viqueira y Bielli, 2016). Los folículos ováricos se clasifican en primordiales, primarios, secundarios y terciarios, estos últimos también llamados folículos maduros o folículos de De Graaf (Figura 2).

El desarrollo de un folículo ovárico se caracteriza por: crecimiento y diferenciación del ovocito primario, proliferación de las células foliculares, formación de la zona pelúcida y desarrollo de la teca folicular (Rodríguez, 2005). En la rata la foliculogénesis se inicia aproximadamente 24 horas después del nacimiento. Antes de este periodo hay de 1 a 2 folículos formados, a las 48 horas de vida postnatal hay 1300 folículos por ovario (Malamed, Gibney y Ojeda, 1992); y en la pubertad existen cerca de 5000 folículos primarios (Crisp, 1992).

1.2.4 Ovulación

La ovulación consiste en un aumento del tamaño folicular seguido de la protrusión del folículo desde la corteza ovárica debido a un ascenso de estrógenos, seguido de un pico de LH y FSH. Luego del pico de LH, la concentración de progesterona en el folículo preovulatorio continúa aumentando, hasta la ovulación. Este esteroide, mediante un mecanismo de retroalimentación negativa, sería el responsable de la finalización del pico de LH (Caron, Goldstein, Savard, y Marsh, 1975). La oleada de LH inicia una cascada de activación de genes en las células de la granulosa, cuyos productos inician la luteinización, le indican al huevo que comience la maduración meiótica y conducen a la ruptura de la pared del folículo (Hillier, 2001).

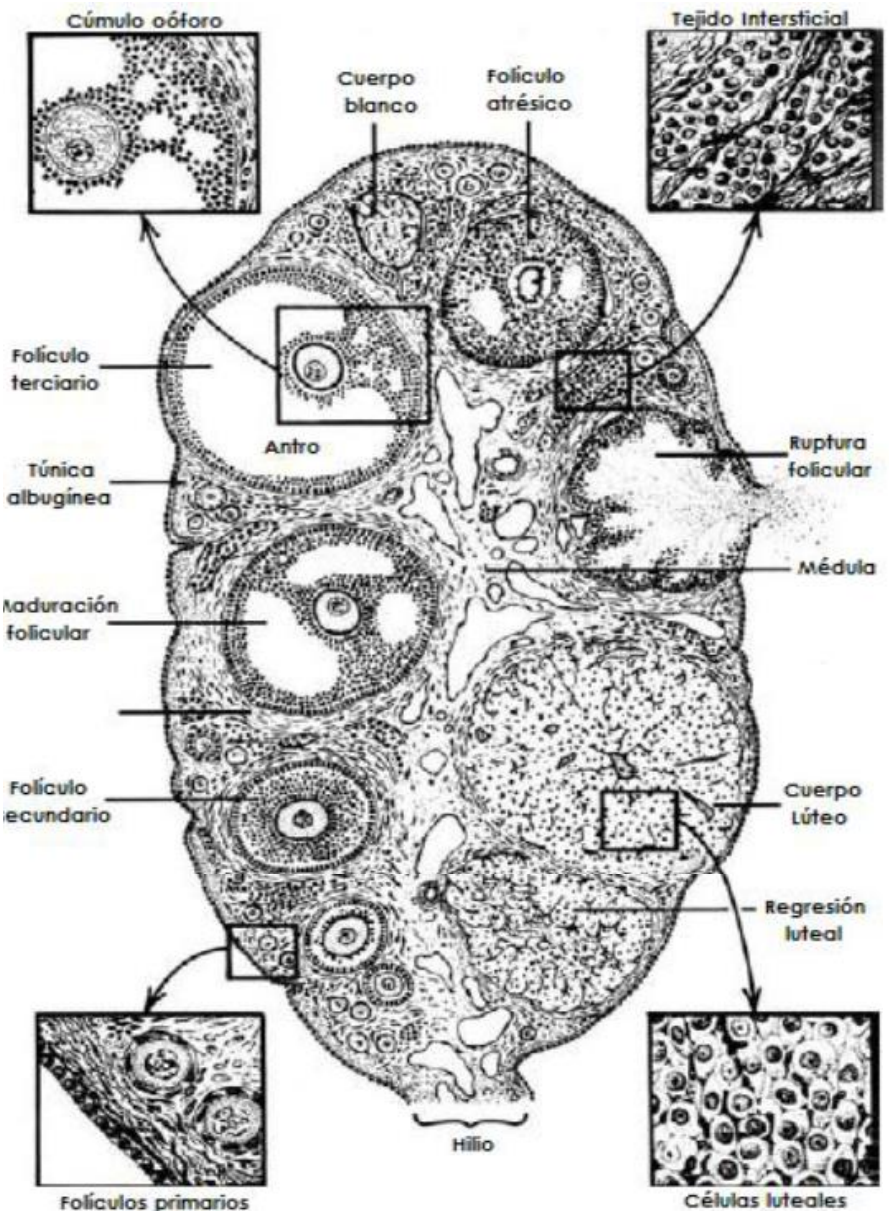

Fig. 2. Esquema del ovario en mamíferos. Fases del desarrollo folicular hasta la ovulación (Modificado de Freeman, 2006)

1.2 INERVACIÓN OVÁRICA

En los mamíferos el ovario recibe inervación simpática de dos fuentes: el plexo nervioso ovárico (PNO), que es un nervio bilateral y tiene una longitud de 2.5 a 3 cm desde el ovario hasta el primer ganglio prevertebral. El PNO derecho e izquierdo corre adyacente y a lo largo de la arteria ovárica y se bifurca aproximadamente 3 mm antes de llegar al ovario, la otra rama va al útero (Figura 3). Mientras que el nervio ovárico superior (NOS) se asocia con el ligamento suspensorio (Figura 4). (Lawrence y Burden, 1980, Pastelín *et al.,* 2017). En general, las fibras del NOS inervan preferentemente los componentes secretorios del ovario, como la glándula intersticial y los folículos, mientras que las fibras del PNO son mayoritariamente perivasculares.

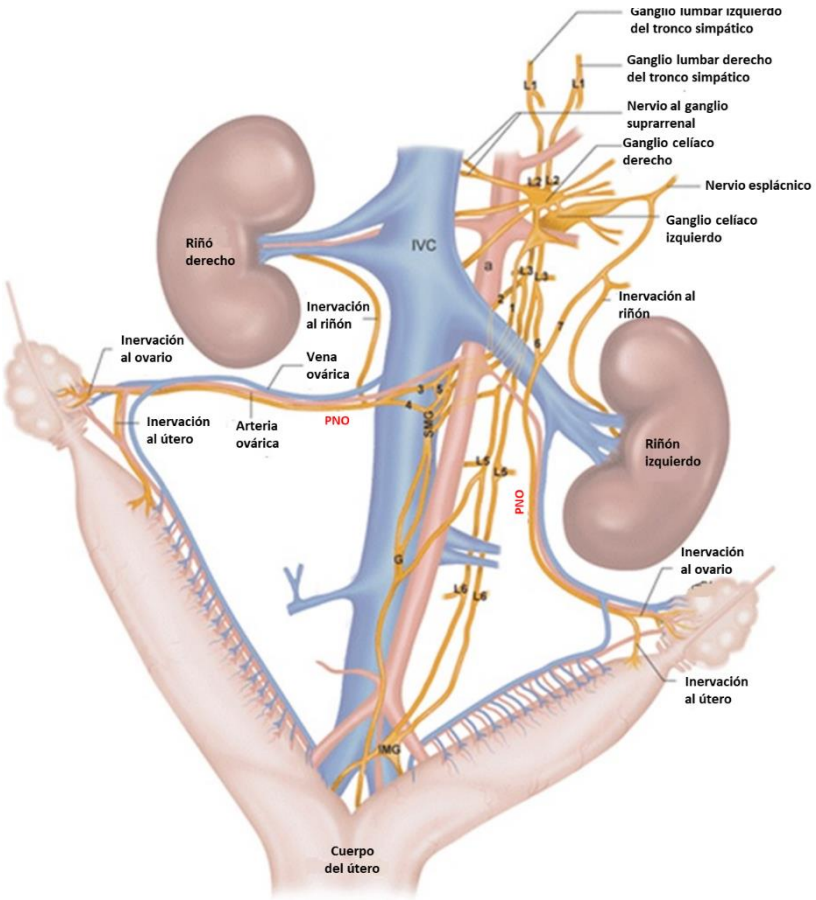

Fig. 3. Esquema que muestra el origen y la distribución del PNO en la rata hembra. (Modificado de Pastelín *et al.,* 2017).

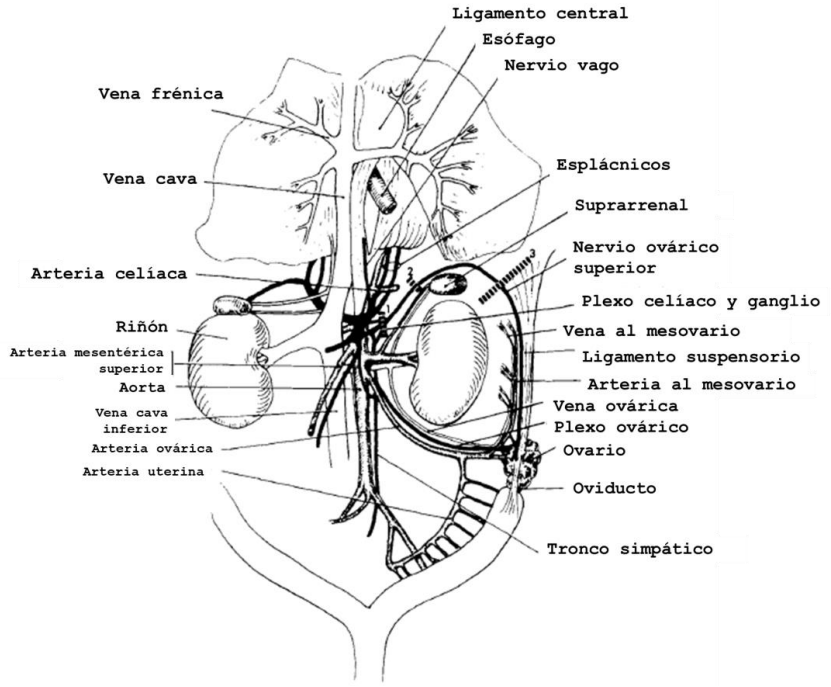

Fig. 4. Representación del curso del nervio que viaja en el ligamento suspensorio e inerva el ovario (marcado como nervio ovárico superior) (Modificado de Lawrence y Burden, 1980).

La inervación simpática que llega a la gónada es por medio del nervio del plexo ovárico y del Nervio ovárico superior, a diferencia del Nervio vago que lleva las fibras parasimpáticas y sensoriales (Burden y Lawrence, 1977).

La inervación extrínseca de la glándula se ha demostrado estar involucrados en la regulación de las funciones específicas del ovario, como la esteroidogénesis y el desarrollo folicular temprano. Esta regulación se ejerce principalmente por la norepinefrina (NE) y el péptido intestinal vasoactivo (VIP). Estos neurotransmisores pueden facilitar el desarrollo folicular. (Greiner, Paredes, Araya y Lara, 2005).

La inervación intrínseca de los ovarios muestra ganglios bien desarrollados situados en el mesovario e hilio que se distribuyen a lo largo del tejido conectivo. Las fibras se presentan antes del desarrollo folicular las cuales son producidas entre las 48-72 horas después del nacimiento y alcanzan su desarrollo máximo alrededor de la pubertad contribuyendo a la activación de la secreción esteroidogénica. (D'Albora, Anesetti, Lombide, Dees y Ojeda, 2002).

1.3 VIAS NEURALES ENTRE LOS OVARIOS Y EL SNC

En los últimos años, la evidencia se ha fortalecido a favor de la existencia de un vínculo neuronal directo entre las gónadas y SNC. Este enlace contiene vías aferentes y eferentes y puede ajustar la actividad funcional o la capacidad de respuesta de las glándulas. Un ejemplo de esta última función es la respuesta compensatoria de hipertrofia después de la extracción unilateral del ovario o la glándula suprarrenal. Tal respuesta también puede ser provocada por la desnervación farmacológica unilateral del ovario. Hay alteraciones bioquímicas unilaterales en el hipotálamo después de la hemiovariectomía, las áreas extrahipotalámicas o la médula espinal, o la transección de uno de los nervios vagos interfieren con la función ovárica (Gerendai y Hala'sz, 1997). Posteriormente estos autores realizaron una inyección del virus de la pseudorrabia en el ovario izquierdo, las células nerviosas marcadas con virus se identificaron por inmunocitoquímica usando anticuerpo policlonal antiviral. Se detectaron neuronas marcadas con virus tanto en la médula espinal como en el cerebro (Gerendai, Tóth, Boldogköi, Medveczky y Halász, 1998). Estos hallazgos proporcionaron la primera evidencia neuromorfológica de la existencia de una vía neuronal multisináptica entre el ovario y el SNC.

Considerando los datos obtenidos con los métodos clásicos de rastreo de vías y la técnica de rastreo viral transneuronal, se puede suponer que el virus viaja desde el ovario a través de los nervios simpáticos hasta llegar al núcleo paraventricular. Dado que existen conexiones recíprocas entre los núcleos del tronco encefálico y el núcleo paraventricular, así como el núcleo del tracto solitario, los circuitos neuronales entre estos núcleos proporcionan una ruta adicional. En la figura 5 se muestran algunas de las estructuras que participan en la conexión neural entre el sistema nervioso central y el ovario. Se ilustra una posible forma de recibir información para la regulación de las funciones ováricas (Gerendai, Kocsis y Halász, 2002).

El mismo grupo liderado por la Dra. Gerendai reportaron que en la rata la vagotomía unilateral bloquea el marcaje de varias estructuras cerebrales cuando se inyecta el virus de la pseudorrabia en el ovario. Los hallazgos indican que la vagotomía interfirió con el marcaje de varias estructuras cerebrales conectadas con el ovario, incluidos los

núcleos vagales. La ausencia del marcaje en estructuras distintas de los núcleos vagales sugiere que la infección de estos grupos celulares en animales con nervios vagos intactos, podría deberse principalmente al viaje del virus a través de estructuras vagales. Estos datos proporcionan una base morfológica para futuras investigaciones para estudiar qué estructuras cerebrales están involucradas y cuál es su importancia funcional en el control de la inervación simpática y parasimpática del ovario (Gerendai, Tóth, Boldogköi, Medveczky y Halász, 2000). La lateralidad hipotalámica en el control gonadal planteó la cuestión de si las estructuras neurales extrahipotalámicas también involucradas en los procesos reguladores gonadales están lateralizadas o no (Gerendai, 1987). En este contexto, se puede mencionar que las lesiones del lado derecho del locus coeruleus, un grupo celular transsinápticamente no marcado desde el ovario después de la vagotomía, interfirieron con el desarrollo de hipertrofia ovárica compensatoria después de la ovariectomía unilateral (Gerendai, 1984; Gerendai *et al.,* 2000). Lo anterior nos permite plantear que la técnica del trazado transneuronal revela algunas de las estructuras involucradas en vía neural de comunicación entre el SNC y los ovarios, pero también puede omitir el marcado de algunas otras que sólo son posible ser mostradas mediante otras técnicas o abordajes experimentales; como las hemicastraciones, desnervaciones quirúrgicas y/o farmacológicas.

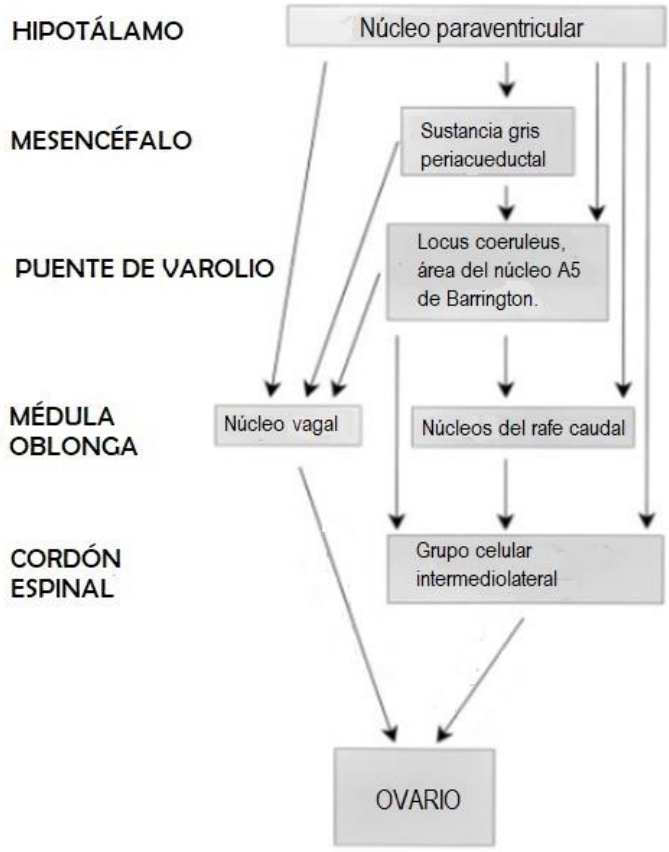

Fig. 5. Esquema simplificado de las conexiones neuronales descendentes conocidas entre las estructuras del SNC marcadas desde el ovario por la técnica de rastreo transneuronal viral (Modificado de Gerendai *et al.*, 2002).

1.4 HIPOCAMPO

El hipocampo, una estructura subcortical importante en el cerebro de los mamíferos, está involucrado en varios tipos de procesos de aprendizaje y la consolidación de la memoria a largo y corto plazo y estrés. Deriva de la región medial del telencéfalo, forma parte del sistema límbico, relacionados con distintos núcleos en los que se encuentran la corteza prefrontal, amígdala, núcleo accumbens y área ventral tegmental (Hernández, Aguilar y García, 2015; Moghadami, Jajanshahi, Sepehri y Amini, 2016).

El hipocampo comprende regiones CA1, CA2, CA3 y CA4 (Lorente de Nó. 1934), dadas de acuerdo con las células piramidales que se localizan en ellas. Anatómicamente, está organizado en el cuerno de Amón (hipocampo propio) y el giro dentado (GD) (separados por la fisura hipocampal); el complejo subicular, formado por el

presubiculum (Para), el subiculum (Sub) y el parasubiculum (Pre) y la corteza entorrinal (EC) (Figura 6). (Lavenex, Lavenex y Amaral, 2007; Amaral y Lavenex, 2007).

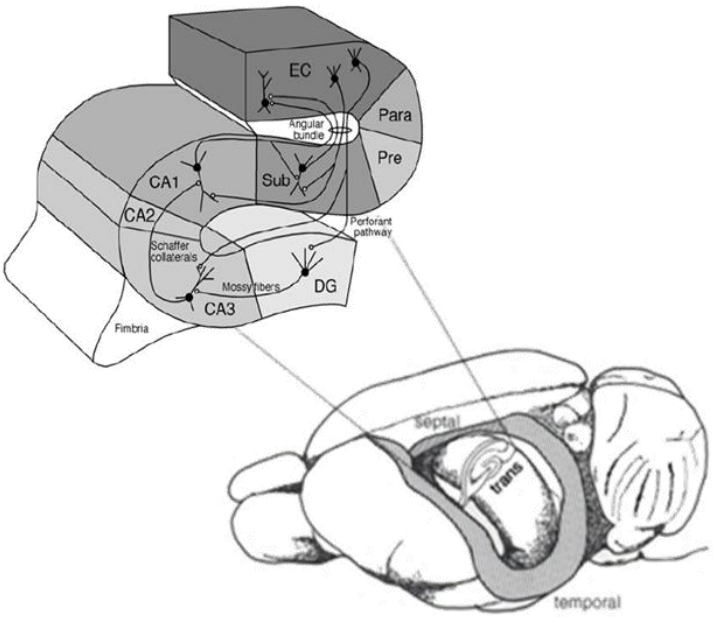

Fig. 6. Esquema de cerebro de rata, mostrando los ejes septotemporales y transversales de la formación del hipocampo. (Modificado de Amaral y Lavenex, 2007).

1.4.1 Neuronas piramidales del hipocampo

Las células poseen distintas características en cada área hipocampal. Las de CA1 presentan en su dendrita apical ramas laterales muy finas, su axón es delgado y con varias colaterales ascendentes. La región CA3 las piramidales tienen mayor tamaño y su dendrita apical se divide en 2-3 ramas verticales, el axón es grueso y produce colaterales o bien cortas que acaban en el stratum oriens, o bien largas que cruzan stratum pyramidale donde constituyen fibras horizontales (colaterales Schaffer) (Gallardo y Elena 1994). De acuerdo con los trabajos realizados por Juraska, Fitch y Washburne, (1989) observaron una diferencia dendrítica entre las neuronas piramidales de eje largo y corto, que probablemente mostrarían un número disímil de sinapsis por cada tipo de neurona. Por otro lado las piramidales CA2 poseen dendritas similares a las de CA3 pero carentes de excrecencias, su axón no produce colaterales Schaffer. En CA4 las piramidales tienen un soma normalmente poligonal, su axón sigue un curso similar al de las de CA3 más próximas al giro dentado.

1.4.2 Conexiones neuronales

Las regiones CA1, CA3 y el GD constituyen el circuito trisináptico del hipocampo, se caracteriza por tres relevos: la primera denominada vía perforante que proviene de la capa II de la corteza entorrinal y es la principal entrada de información del hipocampo y proyecta principalmente al GD y al CA3, por otro lado las proyecciones provenientes de la capa III de la corteza entorrinal proyectan a la región CA1 (Amaral y Witter,1989). Se sabe que las neuronas piramidales CA1 reciben inervaciones de bulbos olfatorios, núcleo accumbens, corteza prefrontal (PFC), amígdala e hipocampo. El segundo relevo de información se da entre el GD y CA3, constituido por fibras musgosas, los axones proyectan las neuronas granulares del GD hacía las neuronas piramidales de CA3 (Bello-Medina, González-Franco y Andrea, 2018). El tercer relevo ocurre entre el CA3 y CA1, en donde las neuronas piramidales pertenecientes a la región CA3 envían sus axones a la región CA1 constituyendo las colaterales de Schaffer (Figura 7) (Amaral y Lavenex, 2007)

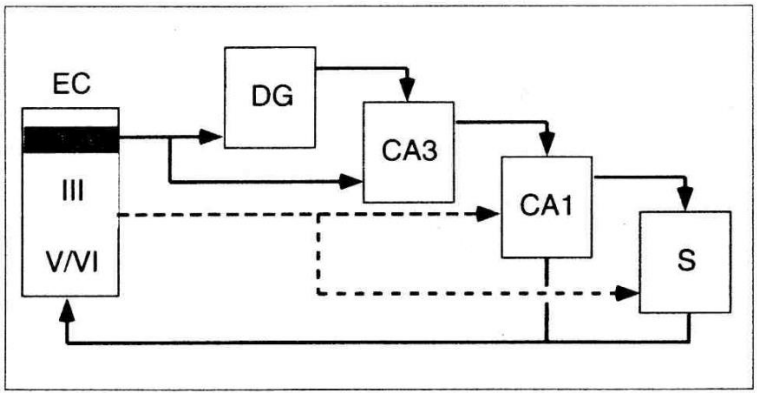

Fig. 7. Diagrama esquemático que ilustra la organización de las dos proyecciones de las vías perforantes hacia los otros campos de la formación del hipocampo. Las células en la capa II de la EC se proyectan al GD y a la región CA3 del hipocampo. Las células en la capa III de la EC dan lugar a una vía distinta que inerva a CA1 del hipocampo y el subículo. Tomado de (Amaral, 1993).

1.5 MODELO DE DESNERVACIÓN SENSORIAL

El estudio de la participación de la inervación sensorial en las funciones reproductivas se ha abordado mediante la desnervación quirúrgica o por desnervación farmacológica. Ésta última el modelo más utilizado es la administración de capsaicina.

1.5.1 Capsaicina

La capsaicina (CAPS) es un protoalcaloide del grupo de los vanilloides derivado de los chiles del género *Capsicum*. Es un polvo cristalino blanco altamente volátil, penetrante, hidrófugo, incoloro e inodoro. Tiene un tamaño de síntesis en el chile mediante la adición de un ácido graso de cadena ramificada a la vanililamina (Fujiwake, Suzuki, Oka y Iwai, 1980). En los últimos años, la CAPS se ha usado ampliamente debido a sus efectos farmacológicos para provocar una desnervación sensorial y fisiológicos. La capsaicina y los compuestos relacionados forman un grupo químico natural llamado capsaicinoides. Después de la irritación violenta inicial, la aplicación de capsaicina vuelve a los animales y al hombre insensibles a otros estímulos químicos nocivos, producen dolor e inhibe la inflamación neurogénica inducida por sustancias químicas irritantes o por la estimulación antidrómica de los nervios sensoriales. Esta desensibilización puede durar semanas o meses después de la administración sistémica en ratas (Fitzgerald, 1983; Ilhan y Erdost 2013,).

El tratamiento neonatal con capsaicina causa la degeneración selectiva de una población distintiva de neuronas sensoriales primarias involucradas en la mediación del dolor quimiogénico (Kjartansson, Dalsgaard y Jonsson, 1987). Como resultado, la capsaicina ha sido un agente farmacológico que ha despertado mucho interés y se está explorando su utilidad en diferentes condiciones clínicas.

1.5.2 Mecanismo de acción

El receptor vanilloide 1 de Potencial Transitorio (TRPV1), que son exclusivamente expresados por neuronas aferentes nociceptivas (Zvara *et al.,* 2005) conocido como receptor de capsaicina, es parte de la familia de canales de iones de potencial de

liberación transitoria (TRP) que ayuda al cuerpo a detectar el calor o la calidez. La administración sistémica de capsaicina en la etapa neonatal ejerce una acción neurotóxica sobre las neuronas sensoriales (Hiura, 2000). La activación de TRPV1 por capsaicina da como resultado la despolarización neuronal sensorial mediada por la entrada de iones de sodio y calcio, y puede inducir la sensibilización local a la activación por calor, acidosis y agonistas endógenos / exógenos. La exposición tópica a la capsaicina provoca sensaciones de calor, ardor o picazón. Las altas concentraciones de capsaicina o las aplicaciones repetidas pueden producir un efecto local persistente en los nociceptores cutáneos, que se describe mejor como desfuncionalización y está constituido por una actividad espontánea reducida y una pérdida de respuesta a una amplia gama de estímulos sensoriales. Las neuronas que reciben aferencias por las fibras C tienen una prolongación central que se proyecta al sistema nervioso central y hace sinapsis para continuar la vía analgésica (Figura 8). Tanto la prolongación periférica como la central acumulan en sus terminaciones péptidos neurotransmisores, mayoritariamente sustancia P, además de neuroquinina A (NKA) y CGRP. La disminución en las concentraciones de péptidos y otros constituyentes de las neuronas sensoriales es probablemente una consecuencia de la acción neurotóxica de la capsaicina (Alvis, Melucci, Quiroga y Mandrile,1995; Anand y Bley, 2011).

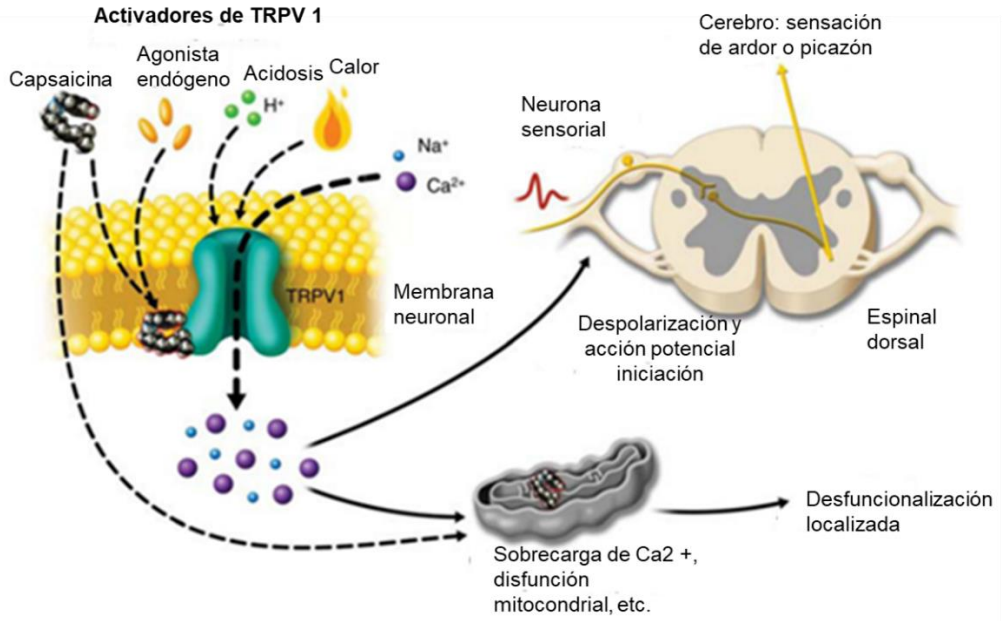

Fig. 8. Esquema de la activación de TRPV1 por capsaicina. (Modificado de Anand y Bley, 2011).

1.6 EFECTOS DE LA ACETIL L-CARNITINA

La Acetil -L- Carnitina (ALCAR) es una molécula pequeña, soluble en agua perteneciente al grupo de las acilcarnitinas derivada de la unión de acetil CoA y L-carnitina que se encuentra principalmente en hígado, riñones y cerebro, en esta última se presenta en niveles relativamente altos y es más alto en el hipotálamo. El ALCAR puede atravesar fácilmente la barrera hematoencefálica, por lo que la suplementación con este compuesto podría favorecer el metabolismo cerebral además de estar relacionada con la movilización de ácidos grasos, la homeostasis de membranas, el mejoramiento energético y protección contra el estrés oxidativo.

En el cerebro, se ha informado que tanto el ALCAR reduce la muerte neuronal y el daño asociado con el envejecimiento, o causados por medicamentos (Jones, McDonald y Borum, 2010), Además, la administración exógena de ALCAR ha inducido modificaciones significativas y positivas en las actividades bioeléctricas cerebrales en animales de experimentación y en el hombre, que son más evidentes con el aumento de la dosis (Postiglione *et al*., 1991).También mejora ciertos aspectos de la memoria ya que permite la síntesis de su neurotransmisor, la acetilcolina, que puede ser muy útil para situaciones de estrés (Souccar, 2006). Todo lo anterior ha permitido el desarrollo de suplementos alimenticios a base de ALCAR, además, se le ha relacionado con la reparación del daño neurológico y la protección ante estrés metabólico a través del restablecimiento de la actividad mitocondrial y la modulación de la expresión genética por lo que se ha convertido en una molécula beneficiosa como tratamiento farmacológico ante padecimientos neurológicos del sistema nervioso central (SNC) como la enfermedad de Alzheimer y Parkinson, así como diversas formas de estados depresivos. (Forloni**,** Angeretti y Smiroldo, 1994; Singh, Mishra, Mishra y Shukla, 2017)
Por otra parte, las propiedades metabólicas de LC y ALCAR han permitido el desarrollo de tratamientos contra la infertilidad femenina. Se sabe de una pequeña diferencia funcional entre ellas, pero ambas se utilizan en la investigación del área de la biología reproductiva para mejorar las funciones mitocondriales del óvulo para tratar la infertilidad. El ALCAR se usa con mayor frecuencia asociado con la mejora de los

efectos antioxidantes / antienvejecimiento, por lo tanto, los estudios que se centran en la mejora de la fertilidad femenina mediada por la defensa antioxidante utilizan preferentemente ALCAR. Varios estudios encontraron que la suplementación con LC y ALCAR mejoran trastornos como el síndrome de ovario poliquístico (Agarwal, Sengupta y Durairajanayagam, 2018), se informó que las carnitinas aumentan los niveles de gonadotropinas como la secreción de la LH y hormonas sexuales estrogénicas como el estradiol (E2), así como mejoran la calidad de los ovocitos (Genazzani *et al.,* 2011).

Por otra parte, la ALCAR muestra efectos positivos sobre el metabolismo mitocondrial, y se muestra prometedor en el tratamiento del envejecimiento y las patologías neurodegenerativas al disminuir la progresión del deterioro mental. Además, ALCAR desempeña efectos neuromoduladores tanto en la morfología sináptica como en la transmisión sináptica. Es probable que estos efectos se deban a los efectos del ALCAR a través de la modulación de la expresión génica en diversas estructuras del sistema nervioso central (Traina, 2016).

1.6.1 Mecanismo de acción

El mecanismo de acción de la L-carnitina sobre la fertilidad femenina. La LC ingresa al ovocito a través de un transportador catiónico orgánico-2 (OCTN2) y a través de su acción directa sobre la calidad de los ovocitos, aumenta la producción de energía por oxidación β, elimina el exceso de palmitato en el retículo endoplásmico (ER) para reducir el estrés del ER, elimina los radicales libres para reducir el daño oxidativo e inhibe las caspasas para prevenir la apoptosis. Implica su acción indirecta a través del eje HPG regulando los niveles de hormonas reproductivas y, por lo tanto, mitiga los trastornos reproductivos como el síndrome de ovario poliquístico (PCOS) y amenorrea. En la endometriosis, mejora el equilibrio hormonal, disminuye la liberación de citocinas y la apoptosis y, por lo tanto, mejora la endometriosis (Figura 9).

CPT1, carnitina palmitoiltransferasa-1; CPT2, carnitina palmitoiltransferasa-2; T, CoA, coenzima A; FFA, ácido graso libre; FSH, hormona folículo estimulante; GnRH hormona liberadora de gonadotropina; IMM, membrana mitocondrial interna; LC, L-carnitina; LH,

hormona luteinizante; mPTP, poro de transición de permeabilidad mitocondrial; OM, membrana ovocitaria; OMM, membrana mitocondrial externa; PRL, prolactina; ROS, especies reactivas de oxígeno; T, translocasa.

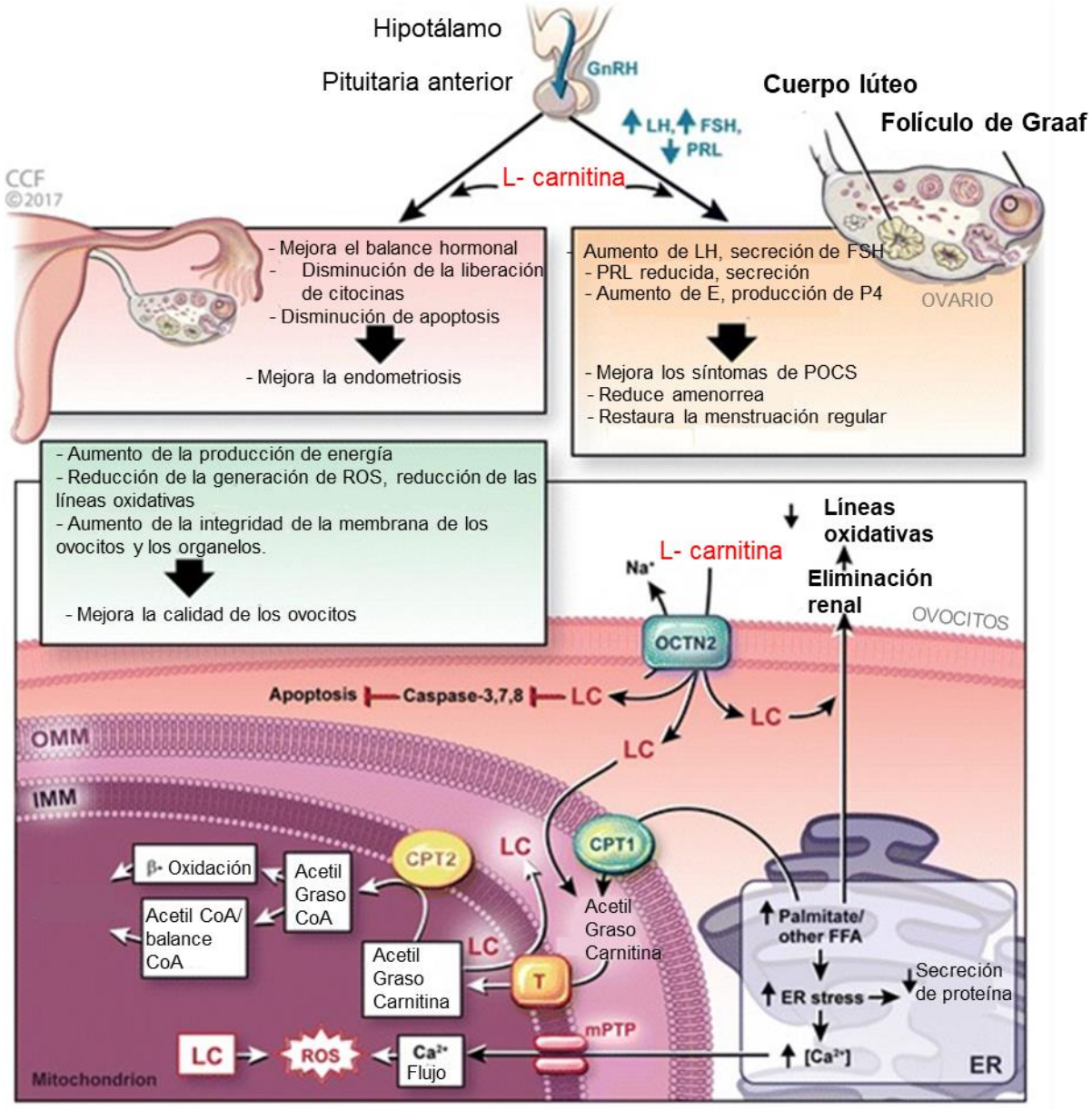

Fig 9. Mecanismo de acción de la L-carnitina sobre la fertilidad femenina. (Modificado de Agarwal *et al.,* 2018).

2. ANTECEDENTES

El inicio de la pubertad en la rata hembra es el resultado de una activación del eje hipotalámico-hipofisario-gonadal, y específicamente, por la liberación de GnRH desde las neuronas hipotalámicas hacia la circulación del portal hipofisario (Prevot, 2015) y el desencadenamiento posterior de la liberación de la hormona luteinizante pulsátil (LH) después de la cuarta semana postnatal (aproximadamente treinta días de edad) (Andrews y Ojeda, 1981). Bajo la influencia de estos episodios secretores de LH, el ovario es estimulado para producir más E2. A su vez, los aumentos sutiles en los niveles de E2 parecen ser capaces de evocar aún más mini secreciones de LH, lo que puede inducir una mayor activación ovárica que conduce a la maduración (Urbanski y Ojeda, 1985; Urbanski y Ojeda, 1986). Con el inicio de la pubertad ya determinado por la activación de la liberación pulsátil de LH, el evento más importante que queda por definir es el momento del primer aumento preovulatorio de gonadotropinas, que, en sí mismo, representa el clímax de la maduración reproductiva neuroendocrina femenina. Debido a que la unidad hipotalámica-pituitaria ya es completamente competente para responder a los niveles preovulatorios de estrógeno con un aumento de LH, la aparición y el momento de este evento final dependen de la finalización de la maduración ovárica. Solo cuando el ovario se vuelve capaz de producir niveles de E2 de magnitud suficiente, y durante un período de tiempo suficientemente largo, se producirá el aumento de LH preovulatorio (Ojeda y Skinner, 2006).

El momento del inicio de la pubertad también está influenciado por otros factores, tanto extrínsecos como intrínsecos.

Dentro de los factores extrínsecos se encuentran las feromonas, estas tienen un papel importante en el inicio de la pubertad, la exposición de ratones hembras a machos o sus excretas induce estro en aproximadamente la mitad de las hembras tres noches después (Ojeda y Skinner, 2006). Por otra parte Dluzen y Vandenbergh, (1992) expusieron a ratones hembras de 24 días de edad, la aplicación en las fosas nasales del extracto urinario proveniente de ratones macho, los resultados mostraron un adelanto de la pubertad evaluado por un incremento en los pesos uterinos. Por los

efectos que produce se le llama extracto urinario acelerador de la pubertad (PAUE, por sus siglas en inglés)

En el contexto de la pubertad, está bien establecido que la maduración sexual en el ratón hembra puede acelerarse de 8-6 días por la presencia de un macho adulto o incluso al introducir a la hembra en una jaula previamente ocupada por el macho (Ojeda y Skinner, 2006). La alimentación también es un factor importante, se sabe que una alimentación alta en grasas en roedores hembras desde el nacimiento o después del destete adelanta el inicio de la pubertad de 7-5 días (Lie, Overgaard y Mikkelsen, 2013), por otra parte una desnutrición en madres gestantes retrasa la pubertad de sus descendientes principalmente en machos (Chernoff *et al.,* 2009).

Pero existente también factores intrínsecos que intervienen en la pubertad, tal es el caso de leptina, que es una hormona peptídica producida principalmente por los adipocitos, la leptina parece tener dos funciones diferentes, como una señal permisiva que interactúa con regiones definidas del cerebro para permitir o prevenir la maduración del eje HPG, y como una señal que media la conectividad de las proyecciones neuronales clave. Con respecto a su papel permisivo en el inicio de la pubertad, la deficiencia de leptina, causada por una mutación de pérdida de función de la leptina o de su receptor, da como resultado un fracaso para completar la pubertad, y en consecuencia, infertilidad (Prevot, 2015).

El propósito de analizar la participación de la inervación simpática y/o sensorial sobre la regulación de las funciones del ovario ha generado algunos métodos para su análisis, como la desnervación quirúrgica que incluye modelos de ovariectomía bilaterales como unilaterales o la utilización de fármacos capaces de provocar una desnervación.

El grupo de Morán, Zarate, Morán, Handal y Domínguez, (2009) demostraron que en ratas hembras durante su periodo prepuberal y juvenil, tienen lugar arreglos en las neuronas posganglionares que alcanzan los ovarios que parten de los ganglios prevertebrales. Los resultados sugieren que él NOS juega un papel importante en el proceso de comunicación entre los ganglios mesentéricos celíacos superiores y los ovarios a medida que se acerca la pubertad.

Se sabe que durante el desarrollo de la rata hembra, se produce un proceso de maduración de los factores que regulan el funcionamiento de los ovarios, lo que da como resultado diferentes respuestas según la edad del animal. Se ha mostrado que en la rata hembra neonata la desnervación sensorial inducida con la administración de capsaicina retrasa la edad del inicio de la pubertad, disminuye el número de folículos, no se observan cambios en la apertura vaginal y se presenta un incremento de los folículos atrésicos y una disminución de la fertilidad. Estos resultados permiten sugerir que la inervación sensorial del ovario envía información al Sistema Nervioso Central necesaria para la regulación de la función ovárica (Morán *et al.,* 2003).

Trabajos previos muestran también un número de folículos presentes en los ovarios que pueden estar regulados por la participación de la información neural. Morán, Morales, Quiróz y Domínguez, (2000) mostraron que la sección del nervio ovárico superior, realizada a los 16 días de edad, provoca un aumento en el número de folículos presentes en la gónadas a los 4 y 8 días después de la desnervación, dónde el 80-90% de folículos son atrésicos, y un aumento en el estradiol y una disminución en la concentración sérica de progesterona. Por otra parte, el grupo de Morales-Ledesma, Betanzos-García y Domínguez-Casalá, (2014) ha demostrado un retraso en la edad de inicio de la pubertad en animales vagotomizados a los 24 y 28 días de edad. Los resultados mostraron en la vagotomía unilateral o bilateral realizada a los 24 días de edad modificó el nivel de progesterona en niveles altos y bajos respectivamente y tampoco modificó las tasas de ovulación ni el número de óvulos. A su vez, la vagotomía bilateral realizada a los 28 días de edad resultó en un aumento en el número de óvulos liberados y niveles bajos de progesterona. La vagotomía unilateral y bilateral realizada el día 24 o 28 dio como resultado una disminución en los niveles séricos de estradiol. Esto indica que la interrupción de la inervación ovárica tuvo un efecto sobre la regulación de las funciones ováricas por parte del SNC y que estos efectos variaron según la edad a la que se realizó la denervación.

Por otra parte, el grupo de Morales (2011) demostró que la ovariectomía unilateral aguda en ratas hembras prepúberes de 32 días de edad provoca una hora después de la cirugía un aumento en la concentración sérica de progesterona y una disminución significativa en la concentración de estradiol. Estos cambios son mayores cuando el

ovario *in situ* es el izquierdo, lo que les permite sugerir a los autores que existe una asimetría en los ovarios para secretar hormonas esteroideas. Los autores sugieren que esta respuesta podría estar relacionada con la cantidad de conexiones neuronales entre el hipotálamo y los ovarios.

Previamente hemos mostrado que en la rata hembra recién nacida la administración sistémica de capsaicina provoca previo a la pubertad una disminución significativa de la actividad de los sistemas noradrenérgico y serotoninérgico de la región del hipotálamo anterior. Estos resultados sugieren que las conexiones del sistema sensorial están relacionadas con la actividad de los sistemas monoaminérgicos hipotalámicos (Quiróz, Morales-Ledesma, Morán, Trujillo y Domínguez, 2014).

Estudios realizados por Trujillo, Morales y Domínguez, (2015) demostraron que la desnervación sensorial inducida por la administración de capsaicina en los días de diestro 1 y 2, no modificó el ciclo estral de los animales y produjo una disminución de la tasa de ovulación en comparación con los animales que no fueron desnervados. Se mostró un aumento significativo en los niveles de progesterona y estradiol en animales ovulantes y no ovulantes desnervados con CAPS, estos resultados permiten sugerir que la inervación sensorial que se transmite al ovario participa de manera estimulante en el mecanismo que regula la ovulación. Más aún su participación varía a lo largo del ciclo estral, siendo el día del diestro 2 el más sensible a dicha participación.

Por otra parte, existen sustancias que pueden tener efectos reparadores del Sistema Nervioso, por ejemplo la acetil l-carnitina (ALCAR) actualmente se usa para el tratamiento del dolor neuropático, la suplementación dietética de ALCAR ejerce efectos neuroprotectores, neurotróficos, antidepresivos. Sus efectos analgésicos a largo plazo dependen de modificaciones epigenéticas, como modificaciones reversibles en la actividad de los genes (Traina, 2016).

La administración de ALCAR en ratas macho con constricción crónica provocó un efecto neuroprotector en la morfología de las neuronas dañadas y un aumento en el grado de mielinización de sus axones. El efecto neuroprotector se debe al aumento de la expresión del factor de crecimiento neuronal. (Tomassoni *et al.,* 2018).

Este incremento de factores neurotróficos puede explicar los mecanismos de plasticidad neuronal que se presentan después de la administración de ALCAR, por ejemplo en la rata con desnervación quirúrgica del nervio ciático la administración sistémica de ALCAR promueve la reparación del nervio y previene la pérdida neuronal. Esta reparación inducida por la administración de ALCAR promueve el aumento del número y la mielinización de los axones comparado con el grupo control (Wilson, Hart, Wiberg y Terenghi, 2010). Se ha demostrado que las propiedades neuroprotectoras de la administración sistémica de ALCAR persisten incluso cuando se inicia el tratamiento con ALCAR hasta 24 horas después de una lesión. En este estudió se demostró que el ALCAR no solo aumentó el número de fibras nerviosas, sino que también mejoró morfológicamente la calidad de la regeneración de las neuronas en parámetros como: diámetro del axón y grosor de la vaina de mielina, que sobreviven a lesiones neurales y la reinervación del órgano. Esto último, nos permitiría ofrecer que el proceso de reinervación fuera más rápido con la ayuda de tratamientos tópicos inmediatos. (Farahpour, y Ghayour, 2014).

Se conoce poco sobre los efectos de la ALCAR en el crecimiento folicular, en la literatura se encontró un trabajo que relaciona la ALCAR con el crecimiento folicular en donde se mostró que en la rata la inducción de la superovulación incrementa las concentraciones ováricas de ALCAR durante las fases del crecimiento folicular y luteal (Costa y Stevenson, 1984). Por todo lo anterior, resulta de gran importancia analizar los efectos de la ALCAR sobre los mecanismos neuroendócrinos y neurales que regulan el inicio de la pubertad, el crecimiento folicular y la plasticidad neuronal del hipocampo.

3. JUSTIFICACIÓN

Poca atención ha recibido en las últimas décadas la participación de la inervación en la regulación de las funciones ováricas. El grupo de Gerendai ha mostrado la existencia de una vía neural entre los ovarios y diversas estructuras del SNC. Curiosamente el hipocampo no aparece, se desconoce si su técnica no la reveló o simplemente no la consideraron dado que tradicionalmente es una estructura cerebral relacionada con procesos de memoria, aprendizaje, estrés e información emocional. Sin embargo, existen algunas evidencias que permiten sugerir que también puede participar en la regulación de la reproducción, previamente hemos mostrado un incremento arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo en ratas macho desnervadas sensorialmente. Por otra parte, está bien demostrado que en modelos animales la desnervación sensorial realizada por vía quirúrgica o farmacológica inhibe el crecimiento folicular, la ovulación y la fertilidad. Existen patologías reproductivas que están asociadas al grado de actividad nerviosa ovárica como el síndrome del ovario poliquístico, el cual se caracteriza por un hiperactividad de los nervios simpáticos que inervan el ovario. Por lo que es muy importante descubrir nuevas alternativas económicas, efectivas e inocuas que restablezcan la actividad nerviosa. Un candidato es la acetil l-carnitina que tiene como principales cualidades para ser utilizada en la hembra la movilización de energía y estimulación de mecanismos de plasticidad neuronal. Por tales razones, resulta de gran importancia comprender como participa la inervación en la fisiología reproductiva y cómo restablecer la comunicación de las vías sensoriales mediante estrategias efectivas que permitan solucionar problemas de infertilidad.

4. HIPÓTESIS

Si la ALCAR estimula la producción de factores neurotróficos que activan mecanismos de plasticidad neuronal, por ende su administración en ratas desnervadas sensorialmente estimulará la vía sensorial que regula los mecanismos neuroendócrinos involucrados en el inicio de la pubertad y el crecimiento folicular. Lo que implicaría cambios en la morfología dendrítica de neuronas piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo de ratas hembras sacrificadas al primer estro vaginal.

5. OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GENERAL

- Analizar los efectos de la Acetil L- Carnitina sobre la pubertad, el crecimiento folicular y la morfología dendrítica de neuronas piramidales del hipocampo en ratas hembras púberes previamente desnervadas sensorialmente al nacimiento con capsaicina.

5.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- Evaluar los efectos de ALCAR sobre la edad de la apertura vaginal y del primer estro vaginal en ratas hembras púberes con o sin denervación sensorial inducida al nacimiento con capsaicina.

- Analizar los efectos de ALCAR sobre el crecimiento folicular de ratas hembras púberes con o sin denervación sensorial inducida al nacimiento con capsaicina.
  - Folículos totales
  - Folículos sanos o atrésicos
  - Folículos preantrales y antrales

- Evaluar los parámetros morfológicos de las neuronas piramidales del hipocampo (CA1 y CA3) de ratas hembras púberes con o sin denervación sensorial inducida al nacimiento con capsaicina.
  - Arborización dendrítica
  - Longitud dendrítica total
  - Longitud dendrítica por número de orden.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente proyecto se utilizaron 18 ratas hembras recién nacidas de la cepa CII-ZV, mantenidas en condiciones ambientales de temperatura y humedad controladas, con ciclo de luz oscuridad de 12 horas, con libre acceso de agua y alimento conforme la NOM-060-ZOO1999 proporcionadas en el "Bioterio Claude Bernard" de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla. Los animales se dividieron equitativamente en tres grupos: un grupo recibió una dosis de 50 mg/kg de Capsaicina ® (Sigma, St. Luis MO, USA) y a partir del día 21 se le administró diariamente solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9%) i.p. como vehículo de la ALCAR (Grupo: CAPS+VH), otro grupo también se le administró la misma dosis de capsaicina y a partir del día 21 de edad y hasta su sacrificio recibieron una dosis diaria de 50 mg/kg de ALCAR ® (Sigma, St. Luis MO, USA) i.p. (Grupo: CAPS+ALCAR). Un tercer grupo recibió vehículo al nacimiento y a partir del día 21 ALCAR (Grupo: VH + ALCAR). Se registró la edad de apertura vaginal y los animales se perfundieron al primer estro vaginal.

6.1 Preparación de fármacos

La capsaicina se disolvió en una solución compuesta por 10% de etanol, 10% de Tween 80 y 80% de solución salina fisiológica (cloruro de sodio al 0.9%). Mientras que la ALCAR se solubilizó en solución salina fisiológica.

6.2 Obtención de muestras

Los animales fueron sacrificados al primer estro vaginal en el Laboratorio de Histofisiología de la Facultad de Ciencias Biológicas mediante anestesia con pentobarbital sódico en dosis de 0.20 ml/ 100 g peso vivo i.p., se les realizó una incisión torácica exponiendo el corazón para realizar la perfusión cardíaca con solución Hartmann (250 ml), por el ventrículo izquierdo del corazón, realizando un corte a la vena cava superior (Figura 10). Se extrajeron los cerebros y se colocaron en 20 ml de solución de Golgi-Cox obtenida del Laboratorio de Neuropsiquiatría del Instituto de

Fisiología de la BUAP. Los ovarios fueron fijados en 20 ml de Bouin para tratamiento histológico.

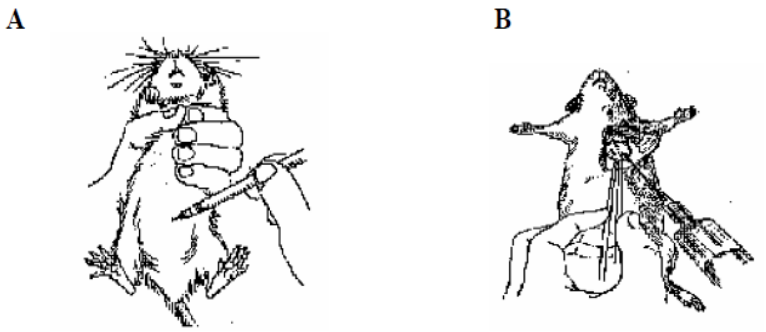

Fig. 10 A) Administración vía ip. De pentobarbital sódico. B) Perfusión de la rata, con solución salina (Hartmann). Tomado de Romero, 2009

6.3 Tinción de Golgi-Cox

Para el protocolo de impregnación los cerebros se mantuvieron durante 30 días en solución Golgi-Cox ($K_2Cr_2O_7$ 170 mM, $HgCl_2$ 200 mM, K_2CrO_4 200 mM), en total oscuridad, con un cambio de Golgi-Cox a los 15 días después de la perfusión, después de este tiempo la solución se remplazó por una solución de sacarosa al 30% y se almacenaron nuevamente en total oscuridad durante 15 días más, con un cambio de sacarosa al 30% a los 7 días antes de ser cortados (este último paso por sacarosa confiere al tejido flexibilidad, por lo que es menos propenso a la resequedad y a la fractura cuando se corta).

6.4 Impregnación con solución Golgi-Cox

Para los cortes histológicos, se montó el cerebro en un vibratomo motorizado (Camden Instrument, MA750) utilizando cianosacrílico como pegamento para posteriormente ser cubierto con agua destilada, se realizaron cortes coronales de 200 µm, se fijaron en laminillas previamente gelatinizadas al 2% presionándolas uniformemente con papel filtro. Las laminillas se mantuvieron en una cámara húmeda y se procedió a realizar el protocolo de revelado de tinción en total oscuridad. Tomada y modificada de la técnica de (Gibb y Kolb, 1998).

- Las laminillas fueron sumergidas en solución de Hidróxido de amonio por 30 minutos.
- Un lavado con agua destilada por 1 minuto.
- Posteriormente se sumergieron en fijador Kodak para película fotográfica (en una disolución 1:1) durante 30 minutos.
- Un último lavado en agua destilada por 1 minuto.
- Deshidratación del tejido mediante el uso de concentraciones crecientes del alcohol.
    - 5 minutos en alcohol al 50%
    - 5 minutos en alcohol al 70%
    - 5 minutos en alcohol al 95%
    - 5 minutos en alcohol al 100%
- Finalmente se sumergieron las laminillas durante 15 minutos en xileno con la intención de aclarar el tejido.
- Se montaron los cortes revelados con resina sintética y se dejaron secar en un cuarto oscuro por unos días para su posterior observación.

6.5 Dibujo y análisis morfológico de las neuronas

Para el dibujo de las neuronas se utilizó un microscopio óptico (Leica modelo DMSL), el cual esta articulada a una cámara lúcida, donde permite al observador dibujar las neuronas a partir de una imagen observada en el microscopio. Se dibujaron 10 neuronas por estructura cerebral (5 neuronas por cada hemisferio). Las neuronas fueron dibujas con el objetivo de 40X, se dibujaron en un plano bidimensional auxiliándose del micrométrico del microscopio. Los dibujos de las neuronas se analizaron por el método de Sholl (Sholl, 1953). Las regiones de interés fueron CA1 y CA3 del hipocampo, para identificarlas y localizarlas se usó como guía el atlas estereotáxico de (Paxinos y Watson, 2007). Las neuronas dibujadas se seleccionaron en base a los siguientes parámetros.

- El soma neuronal debe encontrarse dentro de la región de interés.
- El soma debe poseer una morfología piramidal
- La neurona debe estar completamente teñida e integra.
- No deben estar sobrepuestas con otras neuronas o estructuras para facilitar el trazado.

Realizado el dibujo de la neurona se procedió a realizar el análisis de Sholl, se marcaron con diferentes colores las dendritas de acuerdo con su orden de ramificación, tomando en cuenta como primer orden aquellas dendritas que emergen del soma, las de segundo orden aquéllas que surgen de la bifurcación de las anteriores y así sucesivamente.

La valoración de los datos morfológicos se realizó mediante el análisis de Sholl, el cual consiste en sobreponer una serie de circuitos concéntricos alrededor del soma de la neurona, de los cuales el centro debe coincidir con el soma, de esta manera se determina el número de dendritas que interceptan cada uno de los círculos subsecuentes, lo cual nos permitió evaluar la longitud dendrítica por segmento de 10 µm y el total, así como el número de ramificaciones, pudiendo determinar así el número máximo de orden dendrítico por cada neurona analizada y su arborización dendrítica (Figura 11).

Para el análisis de datos, cada caso será representado por el valor promedio, obtenido de cada circulo (existen 10 µm entre cada círculo que antecede a otro), obteniéndose el número de dendritas que cruzan cada circulo del tal forma que se grafica el número de intersecciones entre las dendritas identificadas y cada circulo concéntrico contra el numero ordinal de cada circulo que se encuentra a 10 µm uno de otro, por tanto contra la longitud del árbol dendrítico.

Por cada neurona dibujada obtuvimos 3 datos importantes que fueron: arborización dendrítica, longitud dendrítica total y longitud por número de orden.

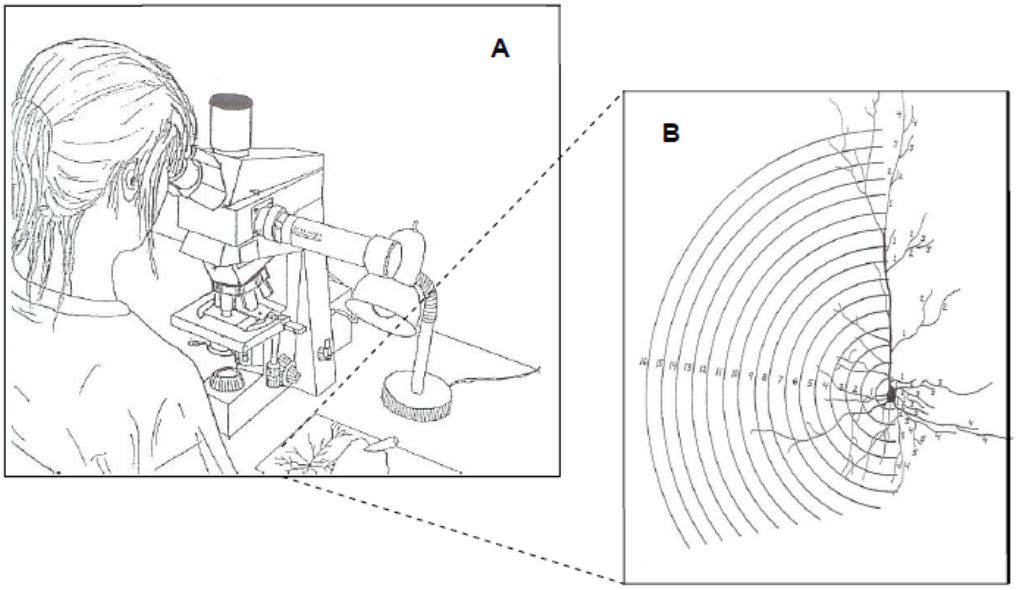

Fig. 11. Esquema de análisis morfológico de la neurona. A) Trazado de neuronas en el microscopio óptico con cámara lúcida. B) Diagrama en el que se muestra la plantilla de discos concéntricos para el análisis de Sholl. (Tomada de Sánchez, 2009)

6.6 Análisis histológico de ovarios

Una vez sacrificados los animales se fijaron los ovarios en solución Bouin, transcurridas las 12 horas se realizó un cambio de Bouin por alcohol al 70%, con respectivos lavados de alcohol 70% hasta disminuir el color amarillo que deja el Bouin al órgano, para después iniciar la deshidratación con cambios crecientes de alcohol y cloroformo.

- 1½ hrs. de alcohol al 96%
- 1½ hrs. de alcohol al 96%
- 1½ hrs. de alcohol al 100%
- 2 hrs. de alcohol al 100%
- Dejar toda la noche en cloroformo usado
- 2 hrs. de cloroformo puro
- 2 hrs. de parafina líquida 1er baño
- Colocar en bloques por 24 hrs.

Listos los cubos de parafina se realizaron cortes de 10 µm en micrótomo manual (Erma Tokyo). Se utilizó la técnica de tinción Hematoxilina-Eosina (H-E) por lo que se procedió

a desparafinar los cortes en una cámara de formol durante 24 hrs. para después pasar al tren de tinción H-E:

- 1.5 min. Xilol
- 1.5 min. Xilol
- 1.5 min. -OH 100%
- 1.5 min. -OH 96%
- 1.5 min. Agua destilada
- 1.5 min. Hematoxilina de Meyer
- 5 min. Agua
- 5 min. Agua
- 5 min. Agua
- 15 s. Eosina
- 1.5 min. -OH 96%
- 1.5 min. -OH 100%
- 1.5 min. Carbol-Xilol
- 1.5 min. Xilol

Terminado el proceso de los cortes histológicos se montó con resina sintética para su análisis por microscopía óptica.

6.7 Análisis del crecimiento folicular

Los cortes de ovarios de 2 animales por grupo se analizaron por microscopia óptica, a todos los folículos ováricos primarios, secundarios y terciarios se les observo su núcleo y nucléolo se analizaron si eran sanos o presentan un signo de atresia como picnosis nuclear, engrosamiento de la teca, descamación, alteración del ovocito, además si presentan o no antro folicular, se contabilizaron y se analizaron los datos.

6.8 Análisis estadísticos

Los datos sobre la edad de apertura vaginal, primer estro vaginal, el crecimiento folicular, tipo y estado folicular de los animales se analizaron con un ANOVA de dos vías ($P<0.05$). Los datos resultantes del análisis de Sholl fueron: longitud dendrítica, la cual se analizó utilizando un ANOVA de una vía ($P<0.05$), arborización dendrítica, número de orden y longitud dendrítica por lateralidad, todos analizados con un ANOVA de dos vías ($P<0.05$). Para cada uno de estos rasgos se utilizó el test de Tukey como prueba post hoc para comparaciones múltiples cuando se presentaron diferencias significativas en las medias. Todos los análisis estadísticos se realizaron en el programa Graph Pad Prism versión 7.0

7. RESULTADOS

A continuación se mostrarán los resultados del efecto de la acetil l-carnitina en ratas hembras púberes desnervadas sensorialmente al nacimiento con capsaicina.

El análisis de Sholl fue realizado en un total de 360 neuronas del hipocampo.

En la región CA1 y CA3 se obtuvo una n de 6 ratas por grupo y se analizaron 180 neuronas respectivamente. Se determinaron los siguientes aspectos: arborización dendrítica, longitud dendrítica, longitud dendrítica por número de orden en 10 µm.

Se realizaron análisis del crecimiento folicular con una n de 2 ratas por grupo, se observaron distintos tipos de folículos y se determinó el inicio de la pubertad usando una n de 6 ratas por grupo.

7.1 Parámetros de pubertad

Al administrar la ALCAR en las ratas hembras desnervadas sensorialmente al nacimiento, mediante la inyección de capsaicina, se observó un adelanto de la edad de apertura vaginal en comparación a las ratas con sólo denervación sensorial. Al analizar la edad del primer estro no se presentaron diferencias significativas en ninguno de los grupos experimentales, sin embargo, se puede observar que en los animales del grupo CAPS+ALCAR muestran una tendencia hacia un adelanto de la edad del primer estro en comparación con CAPS+VH (Figura 12).

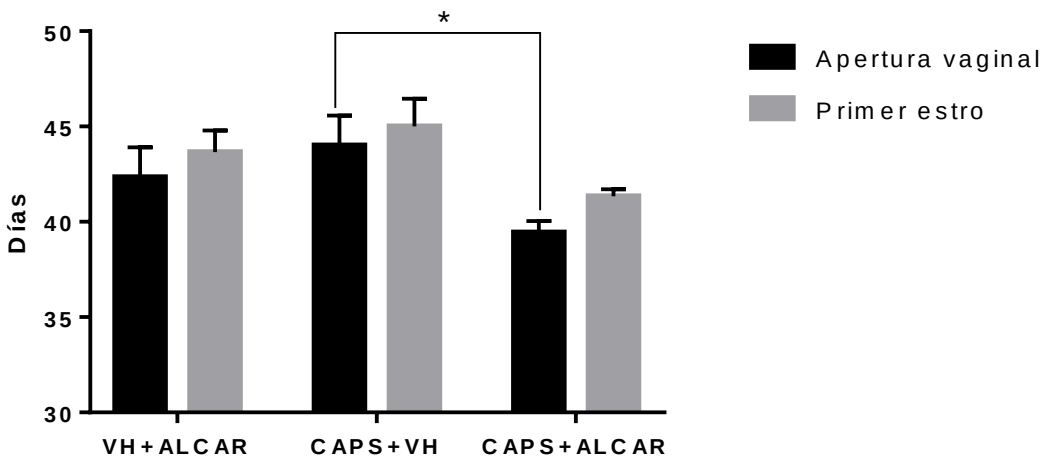

Fig. 12. Comparación de edad de apertura vaginal y primer estro en ratas hembras púberes con o sin desnervación sensorial y tratadas con ALCAR. Se presentan las medias ~~con~~ ± SEM con una n=6 ratas por grupo. *P=0.004.

7.2 Crecimiento folicular

La administración de ALCAR en los animales desnervados sensorialmente provocó un incremento en el número total de folículos en comparación a los otros dos grupos experimentales. Interesantemente, dicho incremento de folículos tienen la condición de ser sanos, mientras que el número de folículos atrésicos se reduce significativamente con respecto al grupo CAPS+VH (Figura 13).

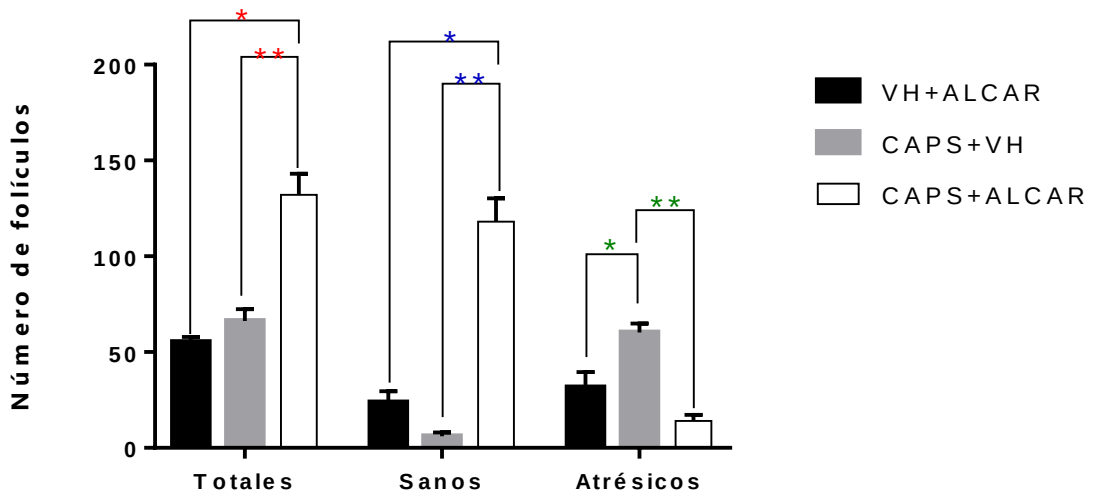

Fig. 13. Efecto de la acetil l-carnitina sobre la población folicular ovárica en ratas hembras púberes con o sin desnervación sensorial. Se presentan las medias con ± SEM con una n=2 ratas por grupo. (*P<0.0001, **P<0.0001, *P<0.0001, **P<0.0001, *P=0.0238, **P=0.0003).

Al analizar la población folicular por ovario los resultados mostraron un aumento significativo en el número de folículos totales y sanos del grupo CAPS+ALCAR en comparación a los grupos VH+ALCAR y CAPS+VH para ambos ovarios. Con respecto a los folículos atrésicos, se encontró una disminución significativa en el número de folículos del grupo CAPS+ALCAR en comparación con el grupo CAPS+VH para el ovario izquierdo (Figura 14a). En el caso del ovario derecho se observa que el tratamiento de ALCAR en ratas, previamente desnervadas sensorialmente o no, reduce el número de folículos atrésicos en comparación a las ratas con sólo desnervación sensorial (Figura 14b).

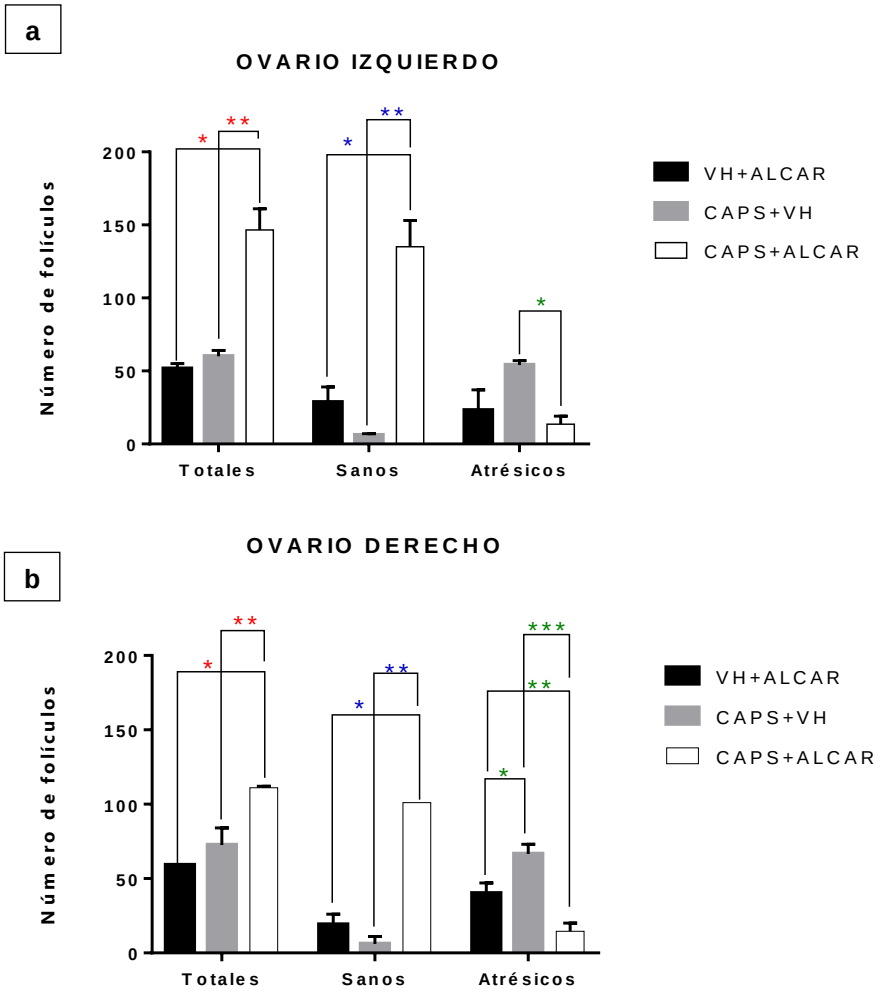

Fig. 14. Efecto de la acetil l-carnitina sobre la población folicular en ratas hembras púberes con desnervación sensorial Se presentan las medias con ± SEM con una n=2 ratas por grupo. **a.** (*P=0.0002, **P=0.0005, *P<0.0001, **P<0.0001, *P=0.0457), **b.** (*P=0.0005, **P=0.0038, *P<0.0001, **P<0.0001, *P=0.0309, **P=0.0371, ***P=0.0005).

La clasificación de los folículos en preantrales y antrales reveló que el incremento de folículos sanos en el grupo CAPS+ALCAR es por un aumento de folículos pequeños, es decir preantrales. El número de folículos antrales no se modificó significativamente en ninguno de los grupos experimentales (Figura 15).

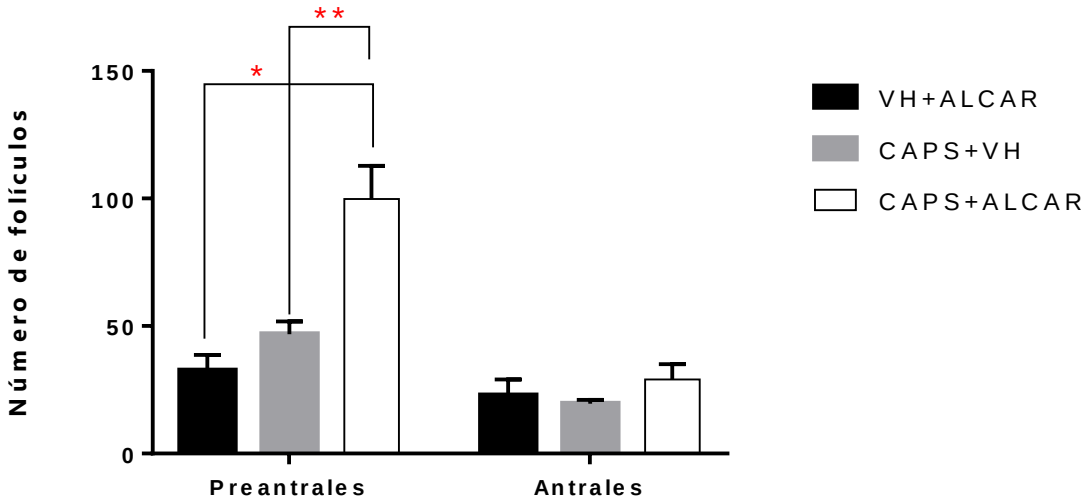

Fig. 15. Efecto de la acetil l-carnitina sobre el tipo folicular en ratas hembras púberes con desnervación sensorial. Se presentan las medias con ± SEM con una n=2 ratas por grupo. (*P<0.0001, **P=0.0002).

La figura 16 muestra que el incremento significativo de folículos preantrales totales observado en el grupo CAPS+ALCAR (figura 15) es por un aumento por parte sólo del ovario izquierdo, en comparación a los otros dos grupos experimentales. En el ovario derecho no se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre los tres grupos experimentales.

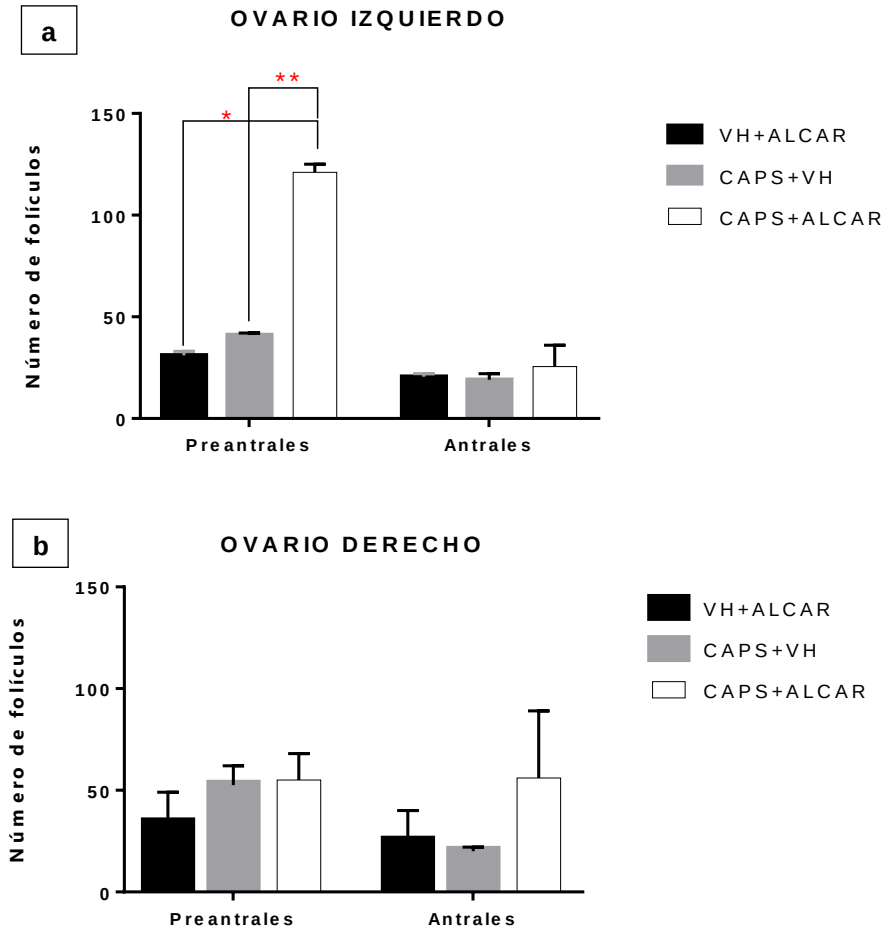

Fig. 16. Efecto de la acetil l-carnitina sobre el tipo folicular en ratas hembras púberes con desnervación sensorial. Se presentan las medias con ± SEM con una n=2 ratas por grupo. **a**. (*P<0.0001, **P<0.0001)

Los datos obtenidos para el estado folicular por porcentaje se analizaron usando como factores independientes el tratamiento y el tipo folicular. Los resultados mostraron que la desnervación sensorial provoca, tanto en folículos preantrales como antrales, un mayor porcentaje de folículos atrésicos que de sanos. La administración de ALCAR en los animales con desnervación sensorial incrementa significativamente el porcentaje de folículos sanos preantrales, en comparación a los grupos VH+ALCAR y CAPS+VH, y también un aumento significativo en el porcentaje de folículos antrales en comparación al grupo CAPS+VH (Figura 17a). En consecuencia el porcentaje de folículos atrésicos disminuyó en el grupo CAPS+ALCAR, en comparación a los otros dos grupos experimentales (Figura 17b).

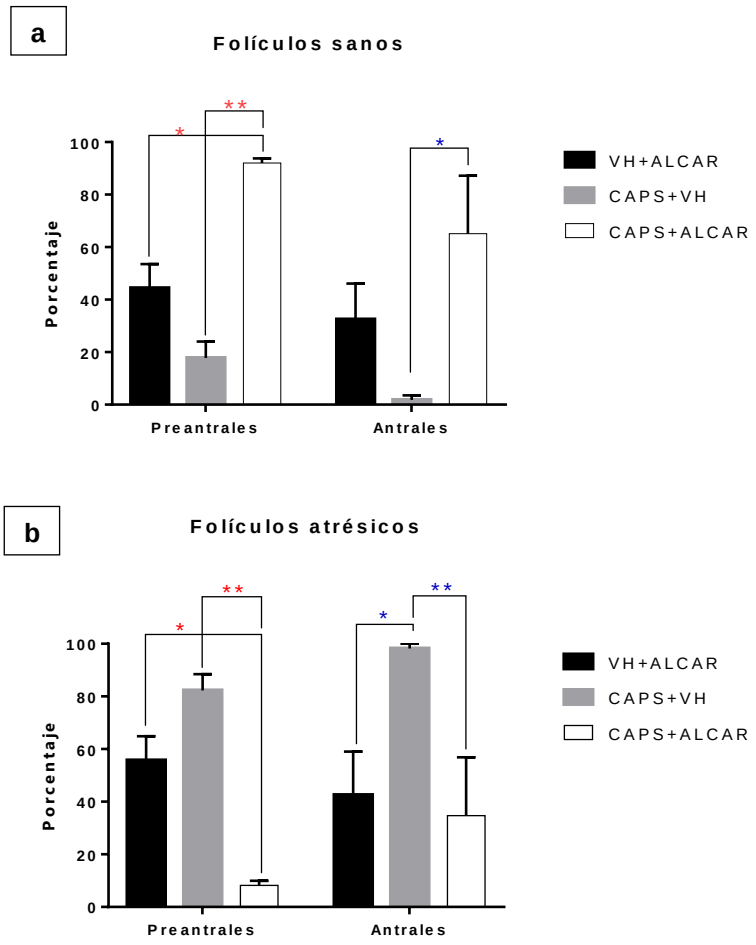

Fig. 17. Efecto de la acetil l-carnitina sobre el porcentaje folicular en ratas hembras púberes con desnervación sensorial. Se presentan las medias con ± SEM con una n=2 ratas por grupo. **a**. (*P=0.0242, **P=0.0007, *P=0.0031), **b.** (*P=0.0331, **P=0.0012, *P=0.0122, **P=0.0046).

7.3 Hipocampo región CA1

Arborización dendrítica

En este parámetro se analizó el número de intersecciones que tuvo el árbol dendrítico cada 10 µm con respecto al soma de la neurona, es decir, cuantas dendritas habían cada 10 µm. El análisis mostró que el mayor grado de arborización se presentó en la zona comprendida entre las 40 y las 160 µm. El grupo CAPS+ALCAR presentó un mayor número de intersecciones en esta región, en comparación con los otros dos grupos experimentales (Figura 18).

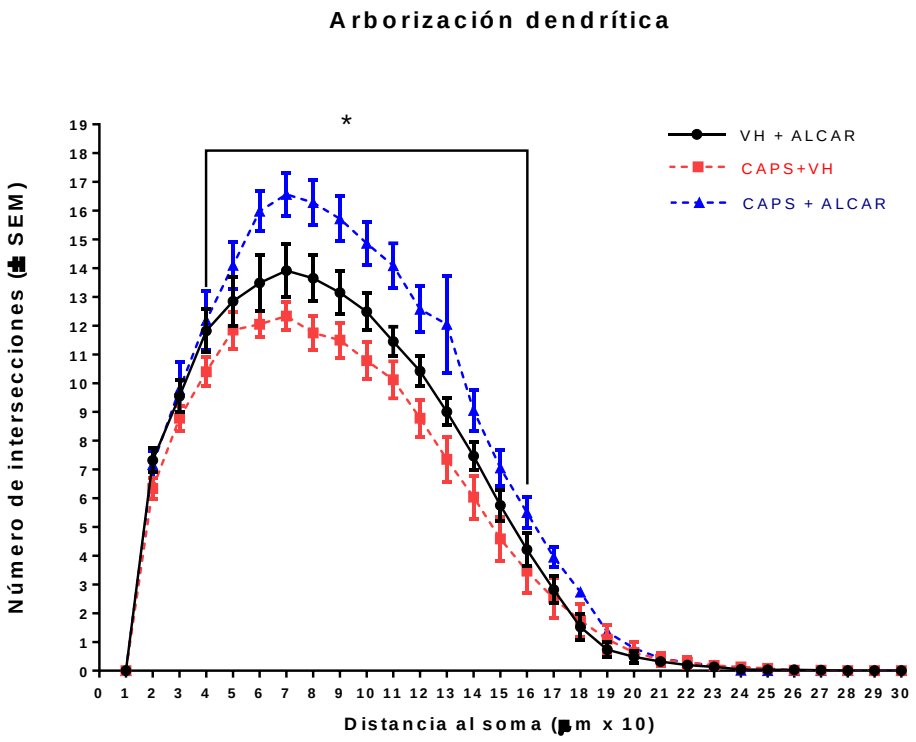

Fig. 18. **Arborización de neuronas piramidales de la región CA1** del hipocampo. Se presentan las medias con ± SEM con una n=6 ratas por grupo y 10 neuronas por cada. (P<0.0001 grupo CAPS+ALCAR vs CAPS+VH y VH+ALCAR).

Longitud dendrítica

Los datos obtenidos del análisis de Sholl para la longitud dendrítica de las neuronas de CA1 del hipocampo mostraron un aumento significativo en la longitud dendrítica total del grupo CAPS+ALCAR con respecto al grupo CAPS+VH (Figura 19).

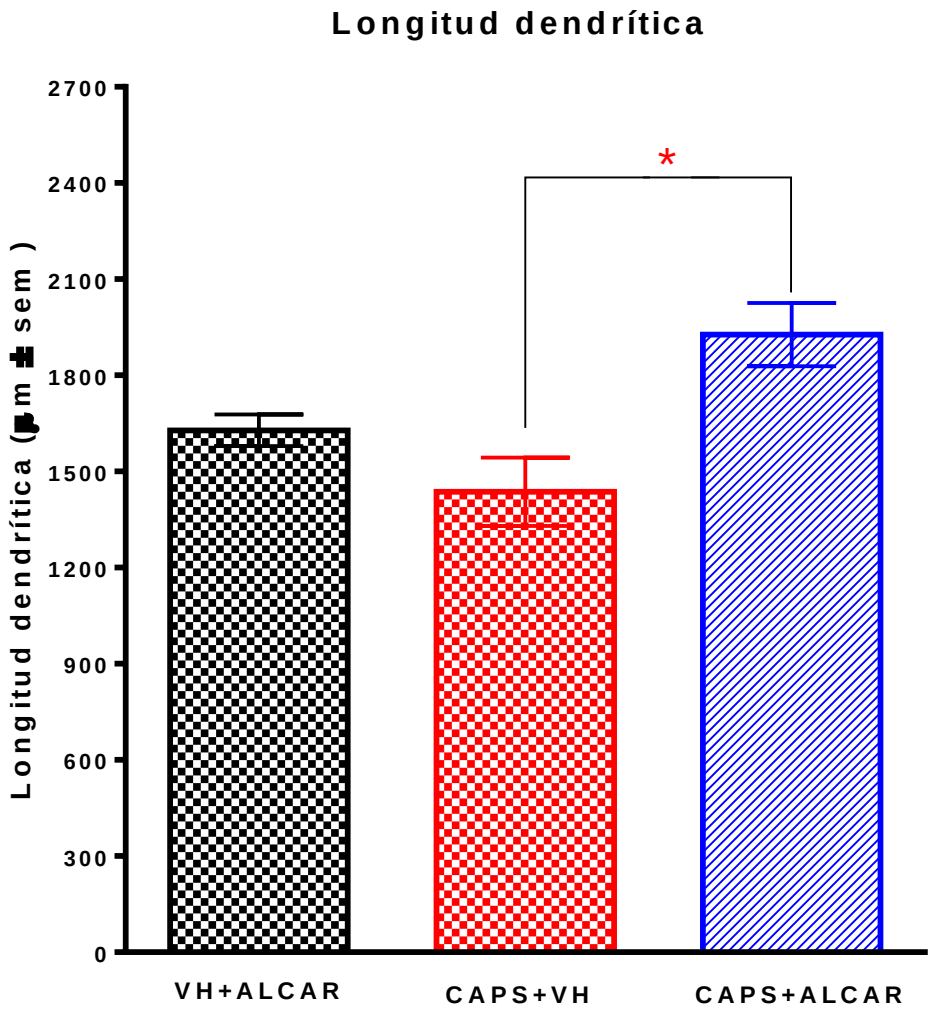

Fig. 19. **Comparación entre la longitud dendrítica total de neuronas piramidales de la región CA1** del hipocampo. Se presentan las medias con ± SEM con una n=6 ratas por grupo y 10 neuronas por cada rata d. (*P<0.0037 grupo CAPS+ALCAR vs CAPS+VH).

Longitud por número de orden

En la gráfica 21 se muestran los resultados de la longitud de neuronas piramidales de CA1 del hipocampo por número de orden, los animales del grupo CAPS+ALCAR mostró un incremento significativo con respecto a los grupos CAPS+VH y VH+ALCAR (Figura 20).

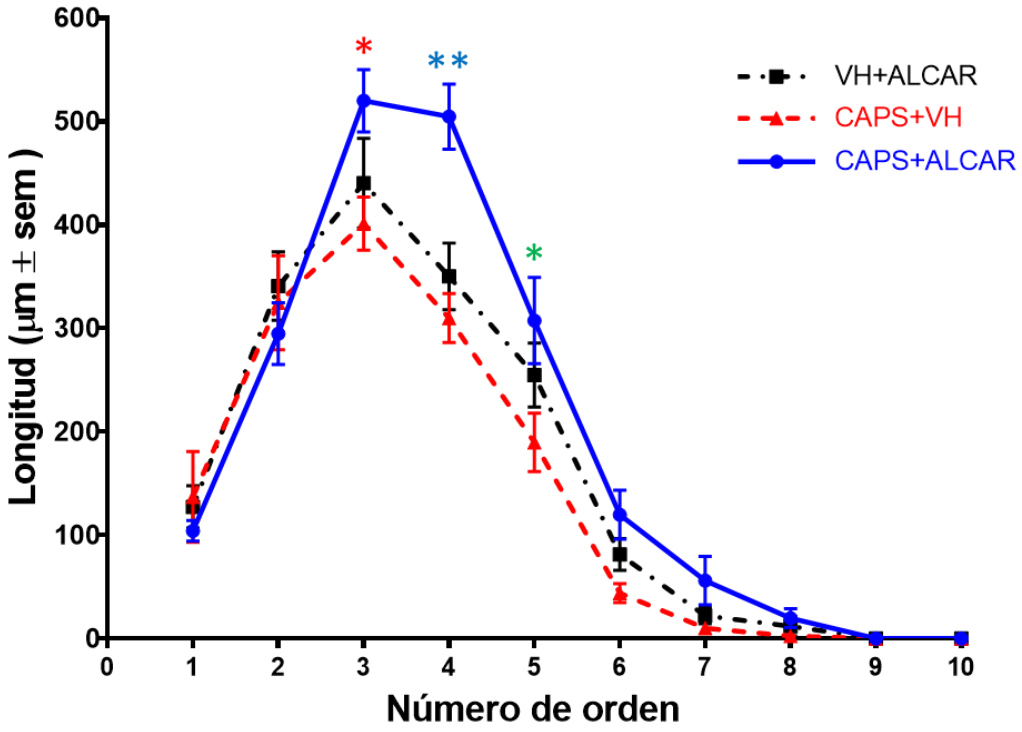

Fig. 20. **Número de orden dendrítico de neuronas piramidales de la región CA1** del hipocampo. Se presentan las medias con ± SEM con una n=6 ratas por grupo y 10 neuronas por cada rata. (CAPS+ALCAR vs CAPS+VH: *P=0.0021; CAPS+ALCAR vs CAPS+VH y VH+ALCAR: **P<0.0001; CAPS+ALCAR vs CAPS+VH *P=0.0023).

7.4 Hipocampo región CA3

Arborización dendrítica

Resultados del análisis de Sholl para la arborización dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo. No se observaron cambios significativos en ninguno de los grupos experimentales (Figura 21).

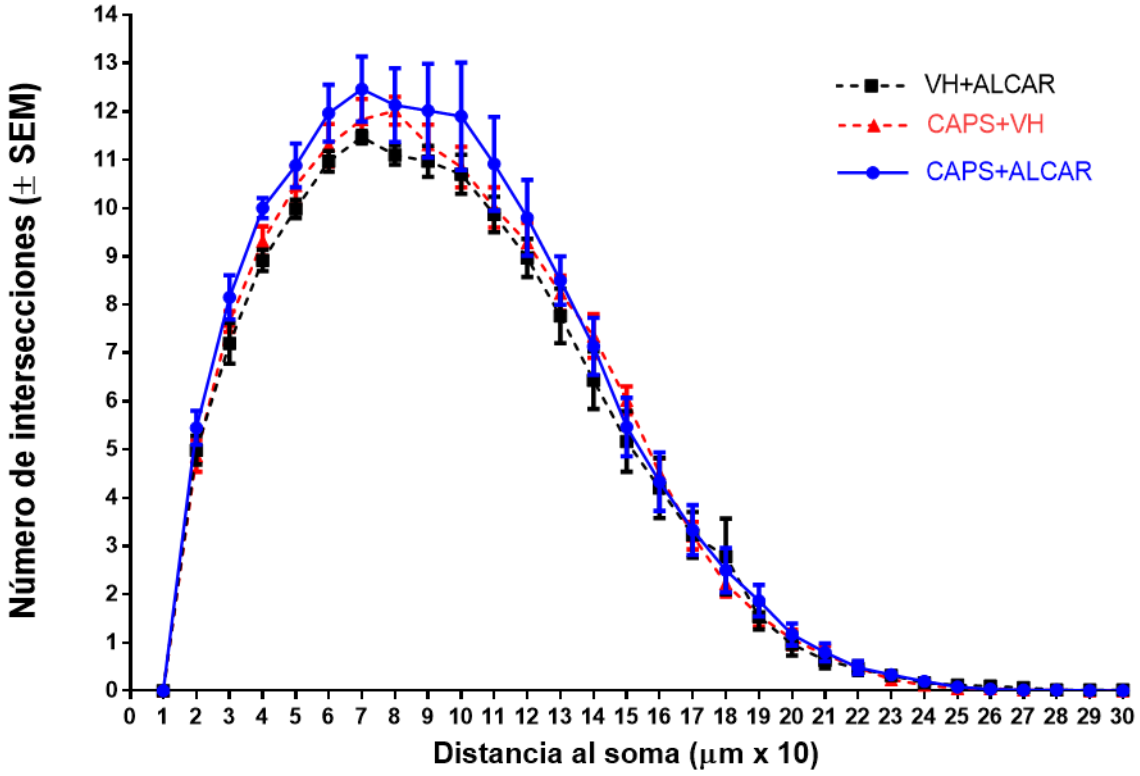

Fig. 21. **Arborización de neuronas piramidales de la región CA3** del hipocampo. Para el análisis de datos se utilizó un ANOVA de dos vías (P<0.05). Se presentan las medias con ± SEM con una n=6 ratas por grupo y 10 neuronas por cada rata.

Longitud dendrítica

Los resultados tampoco mostraron cambios significativos en la longitud dendrítica en ninguno de los grupos experimentales (Figura 22).

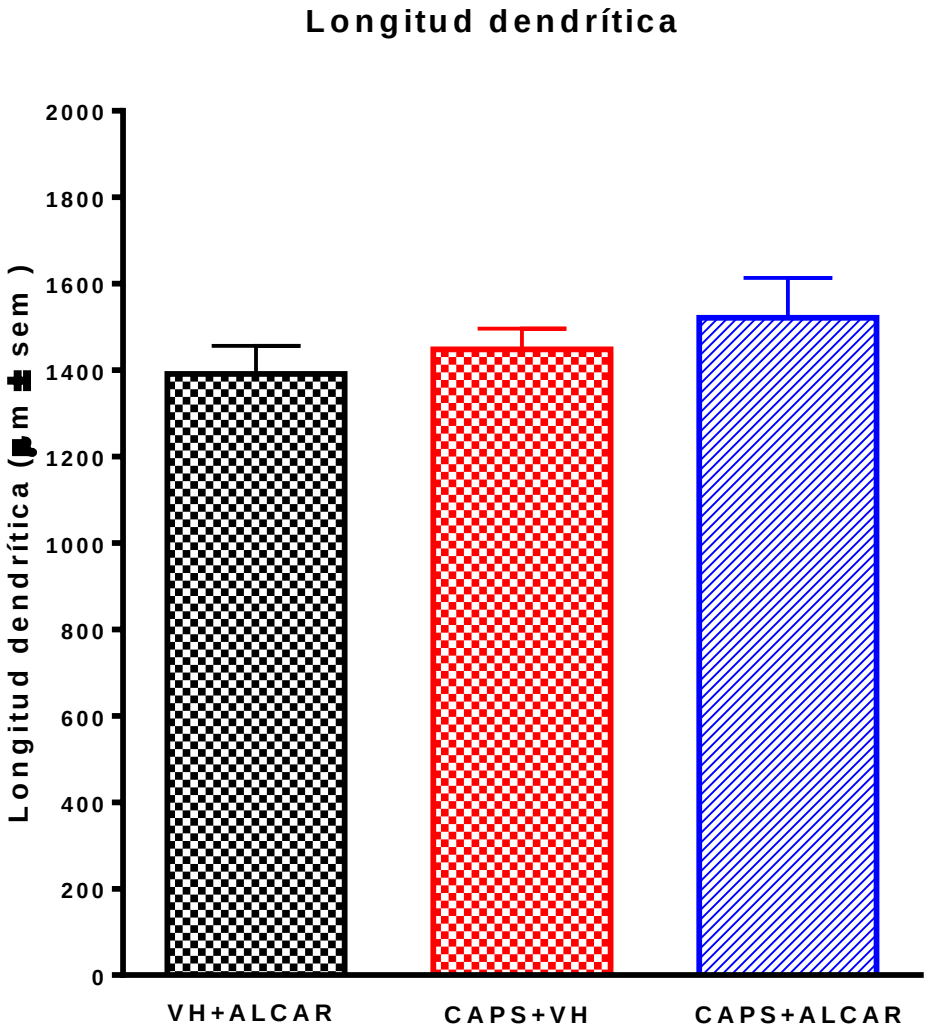

Fig. 22. **Comparación entre la longitud dendrítica** total de neuronas piramidales de la región CA3 del hipocampo. Se presentan las medias con ± SEM con una n=6 ratas por grupo y 10 neuronas por cada rata.

Longitud por número de orden

En la figura 23 se muestran los resultados de la longitud de neuronas piramidales de CA3 por número de orden, los datos obtenidos del análisis de Sholl mostraron en los animales con desnervación sensorial tratados o no con ALCAR un aumento significativo en el tercer orden en comparación al grupo VH+ALCAR. Y un incremento en el quinto orden en los animales del grupo CAPS+ALCAR con respecto al grupo VH+ALCAR.

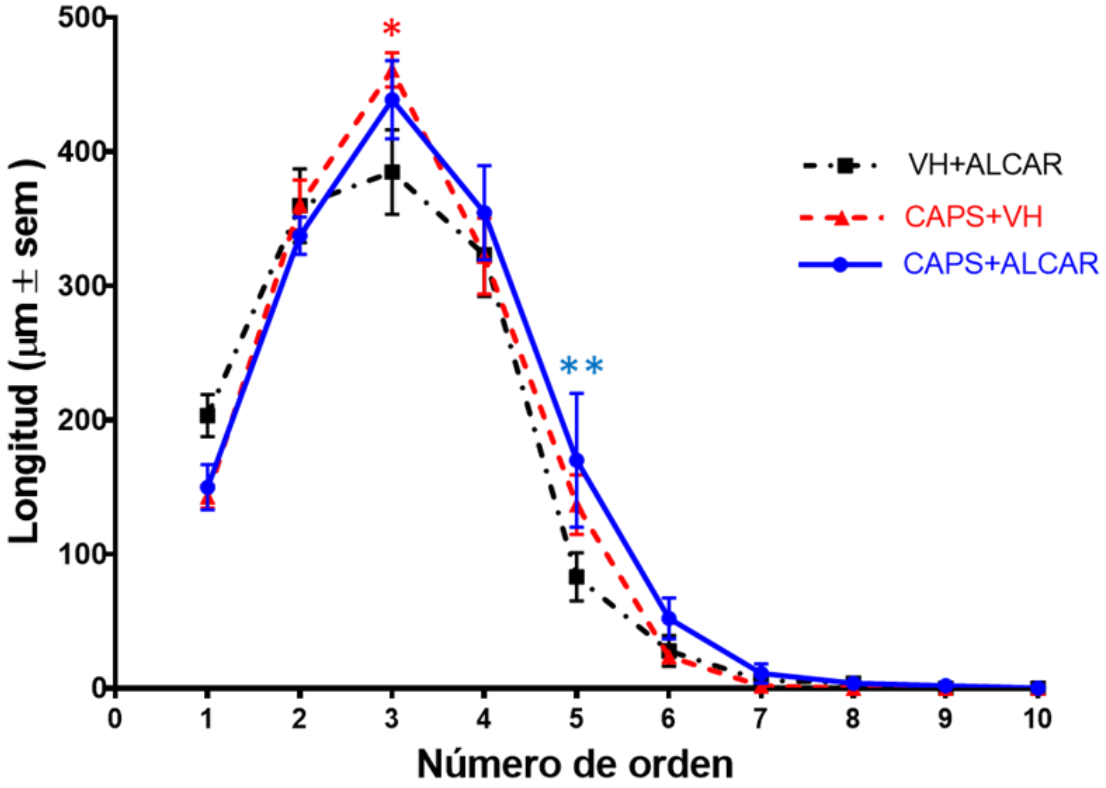

Fig. 23. **Número de orden dendrítico de neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo**. Se presentan las medias con ± SEM con una n=6 ratas por grupo y 10 neuronas por cada rata. (VH+ALCAR vs CAPS+VH: *P=0.0137; CAPS+ALCAR vs VH+ALCAR: **P=0.0040).

7.5 Longitud dendrítica por lateralidad de la región CA1 y CA3

Los datos obtenidos del análisis de Sholl para la longitud dendrítica de las neuronas de CA1 y CA3 de hipocampo fueron analizados usando como factores independientes el tratamiento y la lateralidad del hipocampo. Los resultados mostraron un aumento significativo en la longitud dendrítica de las neuronas ubicadas en el hemisferio derecho de la región CA1 del hipocampo del grupo CAPS+ALCAR con respecto al grupo CAPS+VH (Figura 24).

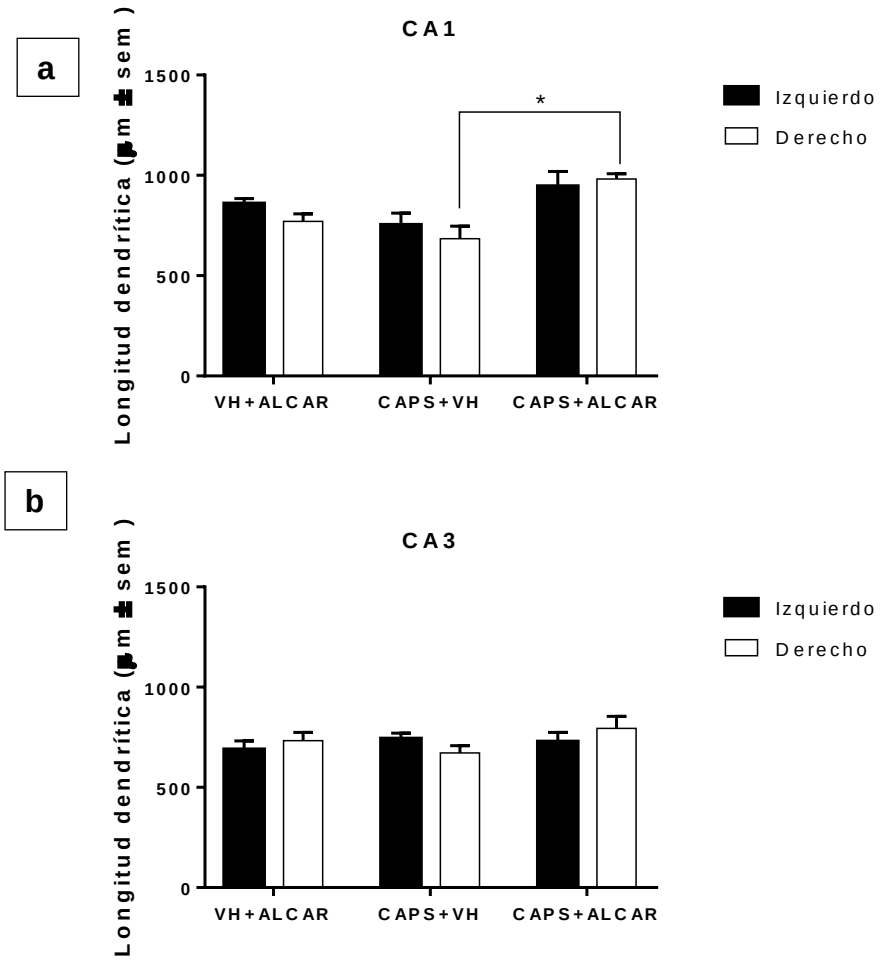

Fig. 24. **Comparación de la longitud dendrítica total por lateralidad de neuronas piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo.** Se presentan las medias con ± SEM con una n=6 ratas por grupo y 10 neuronas por cada rata. **a.** (*P=0.0034).

En la figura siguiente se observan algunas fotografías representativas de las neuronas piramidales de las regiones CA1 y CA3 del hipocampo de ratas hembras púberes (Figura 25)

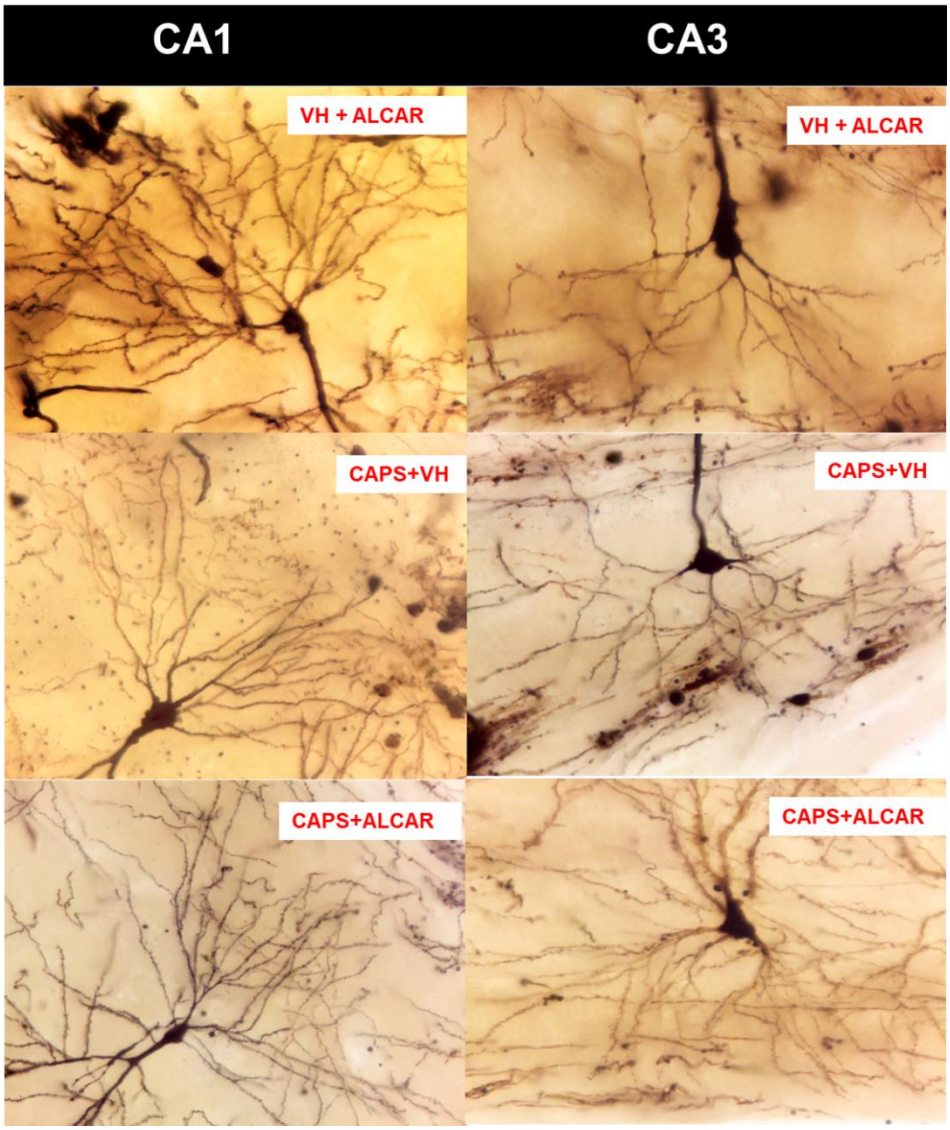

Fig. 25. **Fotografías representativas de las neuronas piramidales de la región CA1 y CA3 del hipocampo** de ratas hembras púberes desnervadas.

8. DISCUSIÓN

En el presente estudio se observó que en los animales del grupo CAPS+VH la administración de capsaicina provocó la aparición de lesiones en la piel, reducción del peso corporal, protuberancias, tal y como como se ha reportado por Carrillo *et al.* (1994). Estos efectos producidos nos permiten tener la certeza de la destrucción de las fibras sensoriales mediante la única dosis de capsaicina.

Nuestros resultados mostraron que la administración de acetil l-carnitina en ratas denervadas sensorialmente mediante la inyección de capsaicina provocó un adelanto de la edad de la apertura vaginal en comparación a la de las ratas que sólo fueron desnervadas sensorialmente. Nuestros resultados apoyan la idea de que la inervación sensorial regula de manera estimulatoria los mecanismos neuroendócrinos que participan en el inicio de la pubertad (Morán *et al.,* 2003; Trujillo *et al.,* 2015). Lo anterior nos permite sugerir que la ALCAR probablemente estimuló en los animales desnervados con CAPS, mecanismos de plasticidad neuronal como la reparación y regeneración de neuronas sensoriales, en apoyo a lo anterior se ha reportado que la administración de ALCAR induce la reparación de nervios seccionados y previene la pérdida neuronal. Eventualmente promueve un incremento en el número y la mielinización de axones, como sucede con el nervio ciático (Wilson *et al*., 2010; Ferreira y McKenna., 2017). Por otro lado, no se puede descartar un efecto de retroalimentación positiva por parte del ALCAR, en los animales desnervados sensorialmente, sobre el eje neuroendócrino hipotálamo-hipófisis-ovarios. El grupo de Krsmanovic, Virmani, Stojilković y Catt, (1992) realizaron experimentos en ratas acíclicas en condición de anestro que fueron inducidas por cambios en el fotoperíodo (expuestas a oscuridad permanente durante tres semanas), tiempo en el cual sólo una mitad de los animales fueron tratados con ALCAR y la otra mitad fueron parte del grupo control. Al restablecer el fotoperíodo normal los autores muestran una recuperación del ciclo estral sólo en los animales tratados con ALCAR, mediante estudios *in vitro*, relacionan esta recuperación con un incremento en la secreción de hormonas como GnRH, LH, PRL y estradiol durante el estro. Estos resultados permiten sugerir que la ALCAR estimula mecanismos

neuroendócrinos que inducen la liberación de GnRH, incrementando los niveles de LH y finalmente de estradiol.

No se observaron adelantos en los parámetros de la pubertad en los animales tratados con VH+ALCAR, sin embargo se mantuvieron en los parámetros normales, posiblemente esto se deba a que la ALCAR no tenga efectos relevantes en animales sin previa desnervación, o bien que sus efectos estimulatorios, en un animal con inervación sensorial intacta, generen una retroalimentación negativa en el circuito neuroendócrino que regula el inicio de la pubertad.

El grupo de Morán *et al.,* (2003) mostraron que en la rata hembra la desnervación sensorial inducida mediante la administración de capsaicina retrasa la edad del primer estro. En el presente estudio los animales del grupo CAPS+ALCAR no presentaron una diferencia en la edad del primer estro en comparación a los del grupo CAPS+VH lo que apoya nuestra idea de que la ALCAR estimula mecanismos neuroendócrinos que participan en la secreción de hormonas esteroides y la ciclicidad vaginal, restableciendo la “normalidad del funcionamiento de las gónadas” en los animales desnervados con capsaicina. El trabajo de Genazzani *et al.,* (2011) muestra que la ALCAR también tiene un efecto en la ciclicidad vaginal, se realizó el estudio en mujeres con amenorrea hipotalámica funcional hipo-gonadotrópicas (LH) y secreción de LH normal, los resultados mostraron un aumento de LH e insulina en mujeres hipo-gonadotrópicas y en ambos grupos se observó la recuperación de la ciclicidad vaginal durante y después de las 16 semanas de administración del ALCAR, lo que sugiere el posible papel positivo de la administración de la ALCAR. Más aún, Domínguez, Cruz, y Chávez, (1989) sugieren que para mantener la ciclicidad del estro, es necesaria la presencia de ambos nervios vagos, ya que la integridad de uno de ellos no es suficiente para compensar la pérdida de información provocada por la sección de uno de ellos.

En cuanto al análisis del crecimiento folicular, nuestros resultados mostraron que los animales desnervados sensorialmente presentaron una menor población de folículos en crecimiento y un incremento del porcentaje de folículos con características atrésicas, lo cual concuerda con lo reportado por el grupo de Morán *et al.,* (2003). Interesantemente la administración de ALCAR en las ratas desnervadas sensorialmente provocó dos

efectos: 1) Un incremento significativo de la población de folículos en crecimiento y 2) Un rescate de folículos de la atresia. Probablemente el primer efecto sea mediante la activación de mecanismos neuroendócrinos y/o neurales que estimulan un incremento en el reclutamiento de folículos primordiales al “pool” de folículos preantrales. Si bien este efecto se observa en ambos ovarios, es mayor en el ovario izquierdo, lo que refuerza la idea de que la inervación puede ser una vía de reclutamiento ya que se ha mostrado que el ovario izquierdo tiene una mayor inervación supraespinal

que el derecho (Tóth *et al.,* 2007). El rescate de la atresia, es decir un incremento de folículos sanos y una disminución de los folículos atrésicos observado en el grupo CAPS+ALCAR puede explicarse por el efecto estimulatorio que tiene el ALCAR sobre la secreción de estrógenos (Krsmanovic *et al*.,1992; Agarwal *et al*., 2018). También esta respuesta en el crecimiento folicular podría estar asociada a los efectos antioxidantes de la ALCAR, ya que se ha mostrado que mejora la calidad de los ovocitos (Liang *et al.*, 2017). Se sabe que un ambiente rico en antioxidantes disminuye los radicales libres que inducen la atresia folicular (Tilly y Tilly, 1995).

Se ha informado que la ALCAR mejora los efectos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y el estrés oxidativo inducido por radicales libres (OS). Con respecto a la fisiología de la reproducción en la mujer, los ROS y los sistemas antioxidantes desempeñan diferentes funciones (Agarwal *et al*., 2018; Agarwal, Gupta, Sekhon y Shah, 2008). En concentraciones adecuadas se comportan como mediadores de la señalización hormonal, la esteroidogénesis ovárica, la ovulación, la formación del cuerpo lúteo y la luteólisis, así como de la función de las células germinales. Diversos estudios han demostrado la relación existente entre ROS del líquido folicular, la foliculogénesis y la esteroidogénesis (Meijide, 2004). Por todo lo anterior, es posible que la aplicación de acetil l-carnitina en las ratas desnervadas sensorialmente mejora los efectos de ROS que inciden en una disminución de folículos atrésicos, un incremento en los folículos sanos y posiblemente una mejor calidad en los ovocitos. En el grupo de VH+ALCAR no se observó un efecto estimulatorio de la ALCAR sobre el número de folículos totales y folículos sanos, puede ser explicado por un aumento en la concentración de antioxidantes que causan a su vez un efecto inhibitorio sobre el

reinicio de la meiosis como ha sido mostrado mediante estudios *in vitro* con ovocitos de rata (Takami *et al.,*1999).

Por otro parte el análisis de la morfología dendrítica de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo de las ratas del grupo CAPS+ALCAR presentaron un incremento en la arborización, longitud dendrítica, número de orden significativamente mayor en comparación a los grupos CAPS+VH y VH+ALCAR. El incremento de la longitud dendrítica apoya lo reportado por el grupo de Lau, Bigio, Zelli, McEwen y Nasca, (2017) quienes mostraron que en la rata con restricción de movimiento, la administración de ALCAR provoca un incremento de la longitud dendrítica en neuronas piramidales de la amígdala basolateral. Incluso puede inducir neurogénesis en el hipocampo de la rata adulta (Singh *et al.,* 2017). No se puede descartar que los cambios observados en la morfología dendrítica de neuronas piramidales CA1 en los animales del grupo CAPS+ALCAR estén asociados a un estímulo en la vía neural ovario-hipotálamo-hipocampo que estimuló un adelanto de la pubertad y los cambios en el crecimiento folicular ya mencionados. Más aún, nuestros resultados apoyan la predominancia de las vías neurales supraespinales del ovario izquierdo (Tóth *et al.,* 2007) y es muy probable que esta vía a nivel encefálico sea contralateral, ya que en nuestro estudio la longitud dendrítica fue mayor en las neuronas piramidales de CA1 derecho.

Existen pocos estudios que muestren que el hipocampo participa en la regulación de las funciones reproductivas. Previamente hemos demostrado que en la rata macho prepúber el bloqueo de la comunicación neural entre el testículo izquierdo y el SNC mediante la hemiorquidectomía unilateral izquierda provoca en la etapa adulta un aumento significativo en la arborización dendrítica y en la longitud dendrítica por número de orden de las neuronas piramidales de la región CA1 del hipocampo (Santos, 2017) acompañado de un aumento en la producción de espermatozoides en el testículo derecho; mientras que en la orquidectomía unilateral derecha provoca en el testículo izquierdo una disminución significativa en el número de espermatozoides así como su viabilidad (González *et al.,* 2016). Todo lo anterior, nos permite sugerir que el hipocampo participa en la regulación de las funciones reproductivas.

Por otro lado, es posible que también los cambios en la morfología dendrítica estén asociados a un posible aumento en las concentraciones séricas de estrógenos. Se sabe que el estrógeno una hormona esteroide gonadal influye mucho en el comportamiento y las respuestas fisiológicas neuroendocrinas. También juega un papel importante en el cerebro, por ejemplo, en la regulación del desarrollo neuronal, la plasticidad y el comportamiento reproductivo (Hösli y Hösli,1999). Dado que el estradiol como la testosterona pueden llegar al cerebro a través de la circulación sanguínea, se han realizado amplios estudios para investigar su papel en la modulación de la plasticidad y función del hipocampo (Woolley, Weiland, McEwen y Schwartzkroin, 1997). Anteriormente Woolley *et al*., (1993) han demostrado los efectos del estradiol y la progesterona en ratas ovariectomizadas sobre la densidad de las espinas dendríticas en las células piramidales CA1 del hipocampo, en donde mostraron el aumento de la densidad dendrítica a partir de las 24 horas posterior a la administración de estradiol y con respecto a la progesterona; esta tiene un efecto bifásico sobre la densidad de las espinas ya que el tratamiento con progesterona después del estradiol inicialmente aumenta, pero luego produce una disminución mucho más aguda. Por otro lado, también se ha asociado cambios en la morfología dendrítica con las concentraciones de prolactina, por ejemplo se ha visto que en ratas ovariectomizadas seguidas de la administración de ácido kaínico y con postratamiento de prolactina, mostraron los efectos neuroprotectores de la prolactina en neuronas piramidales de la región CA1 y la prevención del déficit cognitivo que provoca el ácido kaínico (Reyes-Mendoza, y Morales *et al.,* 2004). En apoyo a lo anterior, se ha mostrado que en la rata la administración de ALCAR provoca un incremento en la secreción de prolactina y estradiol durante el estro (Krsmanovic *et al.,*1992). Mediante la administración de ALCAR pudimos observar en el grupo CAPS+ALCAR cambios en algunos parámetros de pubertad y crecimiento folicular que a su vez se ven influenciados por el posible aumento de estrógenos que puedan modular la morfología dendrítica de las neuronas hipocampales, por lo que respaldamos la idea del rol del hipocampo en los procesos reproductivos. El grupo de Hojo (2004) demostró mediante inmunohistoquímica la expresión de la aromatasa P45017 α como para P450 de los citocromos en las neuronas piramidales hipocampales de las regiones CA1-CA3 así como en las células

granulares del giro dentado en ratas macho adultas. Estos datos sugieren fuertemente que el estradiol se sintetiza endógenamente en las neuronas a partir del colesterol en la formación del hipocampo. Estos resultados indican la necesidad de reconsiderar la creencia de que estos esteroides sexuales se producen sólo en las gónadas y llegan a diversas estructurales cerebrales a través de la circulación sanguínea. En nuestro trabajo no se observaron cambios significativos para las neuronas piramidales de la región CA3 excepto para el parámetro de longitud dendrítica por número de orden. Dentro del hipocampo, estudios han sugerido diferencias importantes en la función de las áreas CA1 y CA3 (los principales campos de células piramidales en el hipocampo) en la memoria espacial y contextual (Ji y Maren, 2008), probablemente la desnervación sensorial induce en el área del hipocampo CA1 y CA3 efectos diferenciales que se ven reflejados en la morfología dendrítica de las neuronas. Por otra parte Farovik, Dupont y Eichenbaum, *(*2010) analizaron los efectos de la lesión, mediante la inyección de ácido iboténico, de las subregiones del hipocampo dorsal CA3 y CA1 sobre la memoria para el orden de elementos no espaciales asociados secuencialmente. Las ratas con lesiones de CA3 se vieron gravemente afectadas en la memoria, pero las ratas CA1 se desempeñaron tan bien como los controles. Se observó un daño promedio del 62% para el área CA3 y un promedio del 39% para la región CA1, siendo más sensible y esencial CA3 para procesos de memoria: Dado que en nuestro estudio encontramos un incremento arborización, longitud dendrítica y número de orden sólo en las neuronas piramidales de CA1 del grupo CAPS+ALCAR nos permite sugerir que estén asociados a un aumento de la comunicación neural entre los ovarios y el SNC, incluyendo el hipocampo, como una respuesta compensatoria ante la desnervación sensorial neonatal. También sugerimos que CA1 estaría asociada a la vía de comunicación neural entre los ovarios y el SNC en el control de la reproducción. Estos trabajos sugieren la diferencia de roles de estas dos regiones del hipocampo, especulamos que mediante la administración de ALCAR se podría restablecer la reinervación de estas fibras sensoriales que afectan directamente las estructuras cerebrales y gonadales. Se requieren más estudios que prueben esta hipótesis.

9. CONCLUSIONES

- La administración de ALCAR en las ratas hembras desnervadas sensorialmente induce un adelanto de la edad en la apertura vaginal con respecto a los animales tratados con sólo capsaicina o acetil l-carnitina.
- En las hembras desnervadas sensorialmente la administración de ALCAR estimula mecanismos neuroendócrinos y/o neurales que reclutan un mayor número de folículos y los rescatan de la atresia.
- El efecto del ALCAR sobre el aumento de folículos y disminución de la atresia es asimétrico, siendo mayor en el ovario izquierdo.
- En las ratas hembras la administración de ALCAR posterior a la desnervación sensorial, induce un aumento de la arborización y longitud dendrítica, así como en el número de orden de las neuronas piramidales de la región CA1.
- La acetil l-carnitina provocó un mayor aumento de la longitud dendrítica de neuronas piramidales de CA1 del hemisferio derecho de las ratas hembras desnervadas sensorialmente.
- En las ratas hembras desnervadas sensorialmente la administración de acetil l-carnitina, induce un aumento de la longitud dendrítica en las neuronas piramidales por número de orden de la región CA3 del hipocampo, con respecto al grupo con sólo desnervación sensorial.

10. PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo resultan de gran relevancia considerando la poca atención que se le ha dado al hipocampo como una región del Sistema Nervioso Central relacionado con el control de las funciones gonadales, por lo cual consideramos las siguientes opciones:

Por otro lado al administración de ALCAR permite agregar una ventaja más a la lista de beneficios que puede provocar este fármaco. También no menos importante es que el tratamiento crónico de acetil l-carnitina en organismos "sanos" puede tener efectos adversos. Por lo que sería necesario realizar un estudio dosis-respuesta del ALCAR tanto en el modelo crónico como agudo.

Resultaría necesario llevar a cabo un estudio de los ganglios celiacos para analizar si el número de neuronas se modifica en nuestro modelo experimental.

Ahondar en la participación de la vía neural de los ovarios y el Sistema Nervioso Central, en especial del hipocampo.

Analizar la fertilidad en nuestro modelo experimental y medir los niveles séricos de las hormonas esteroides sexuales, principalmente estradiol.

Probar mediante estudios de inmunohistoquímica la existencia de una posible reinervación de las fibras sensoriales del ovario de las ratas del grupo CAPS+ALCAR.

11. ANEXOS

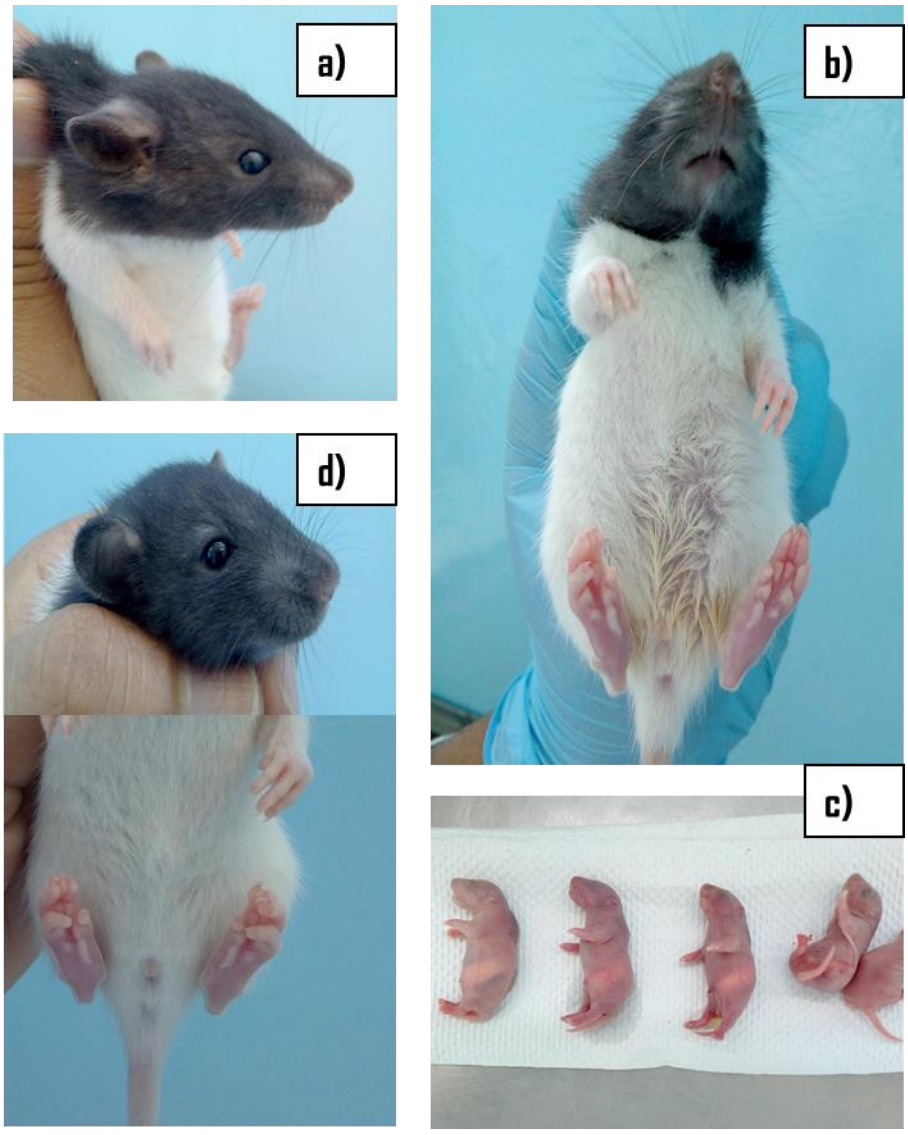

Fig. 26. **a, b, c) Efectos de administración de CAPS**, d) **VH de CAPS** en ratas hembras de 21 días posnatales.

12. REFERENCIAS

Agarwal, A., Gupta, S., Sekhon, L., y Shah, R. (2008). Redox considerations in female reproductive function and assisted reproduction: from molecular mechanisms to health implications. Antioxidants y redox signaling, 10(8), 1375-1404.

Agarwal, A., Sengupta, P., y Durairajanayagam, D. (2018). Role of L-carnitine in female infertility. Reproductive Biology and Endocrinology, 16(1), 5.

Alvis G., Melucci J., Quiroga P., y Mandrile E. (1995). Capsaicina. Acta Farmacéutica Bonaerense 14(1): 63-70.

Amaral, D. G. (1993). Emerging principles of intrinsic hippocampal organization. Current opinion in neurobiology, 3(2), 225-229.

Amaral, D. G., y Witter, M. P. (1989). The three-dimensional organization of the hippocampal formation: A review of anatomical data. Neuroscience, 31(3), 571–591.

Amaral, D., y Lavenex, P. (2007). Hippocampal neuroanatomy. In: En P. M Andersen, The Hippocampus Book. (pp. 60-80). New York, USA: Oxford University Press, Inc.

Anand, P., y Bley, K. (2011). Topical capsaicin for pain management: therapeutic potential and mechanisms of action of the new high-concentration capsaicin 8% patch. British journal of anesthesia, 107(4), 490-502.

Andrews, W., y Ojeda, S. (1981). A detailed analysis of the serum luteinizing hormone secretory profile in conscious, free-moving female rats during the time of puberty. Endocrinology, 109(6), 2032-2039.

Bello-Medina, P. C., González-Franco, D. A., y Andrea, C. M. (2018). El hipocampo: historia, estructura y función. TEPEXI Boletín Científico de la Escuela Superior Tepeji del Río, 5(10).

Burden, H.W., y Lawrence, I.E. (1977). The effect of denervation on compensatory ovarian hypertrophy. Neuroendocrinology, 23(6): 368-378.

Caravaca Rodríguez, F., Castel Genís, J., Guzmán Guerrero, J., Delgado Pertíñez, M., Mena Guerrero, Y., Alcalde Aldea, M., y González Redondo, P.

(2008). Bases de la producción animal (1st ed., pp. 56-58). España: Universidad de Sevilla. Secretariado de publicaciones

Caron MG., Goldstein S., Savard K. y Marsh J., (1975). Protein kinase stimulation of a reconstituted cholesterol side chain cleavage enzyme system in the bovine corpus luteum. Journal of Biological Chemistry, 250(13), 5137-5143.

Chernoff, N., Gage, M. I., Stoker, T. E., Cooper, R. L., Gilbert, M. E., y Rogers, E. H. (2009). Reproductive effects of maternal and pre-weaning undernutrition in rat offspring: age at puberty, onset of female reproductive senescence and intergenerational pup growth and viability. Reproductive Toxicology, 28(4), 489-494.

Costa, N. D., y Stevenson, P. M. (1984). Changes in coenzyme a and carnitine concentrations in superovulated rats. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism, 792(2), 130-134.

Crisp, TM. (1992). Organization of the ovarian follicle and events in its biology: oogenesis, ovulation or atresia. Mutation research, 296(1-2): 89-106.

D'Albora, H., Anesetti, G., Lombide, P., Dees, WL, y Ojeda, SR (2002). Neuronas intrínsecas en el ovario de los mamíferos. Investigación y técnica en microscopía, 59 (6), 484–489.

Dluzen, D., Guan, X., y Vandenbergh, J. G. (1992). Puberty acceleration in female mice induced with a partially purified male urine extract: effects on catecholamine release from the olfactory bulbs and hypothalamus. Brain research, 585(1-2), 367-371.

Domínguez, R., Cruz, M. E., y Chávez, R. (1989). Differences in the ovulatory ability between the right and left ovary are related to ovarian innervation. In Growth factors and the ovary (pp. 321-325). Springer, Boston, MA.

Farahpour, M. R., y Ghayour, S. J. (2014). Effect of in situ delivery of acetyl-L-carnitine on peripheral nerve regeneration and functional recovery in transected sciatic nerve in rat. International Journal of Surgery, 12(12), 1409-1415.

Farovik, A., Dupont, L. M., y Eichenbaum, H. (2010). Distinct roles for dorsal CA3 and CA1 in memory for sequential nonspatial events. Learning y Memory, 17(1), 12-17.

Filipiak, Y, Viqueira, M, y Bielli, A. (2016). Desarrollo y dinámica de los folículos ováricos desde la etapa fetal hasta la prepuberal en bovinos. Veterinaria (Montevideo), 52(202), 2

Fitzgerald, M. (1983). Capsaicin and sensory neurones—a review. Pain, 15(1-4), 109-130.

Forloni, G., Angeretti, N., y Smiroldo, S. (1994). Neuroprotective activity of acetyl-L-carnitine: Studies in vitro. Journal of neuroscience research, 37(1), 92-96.

Freeman ME. (2006). Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. p. 2327-2388. In: Neill JD. (ed.). Knobil and Neill's Physiology of Reproduction Vol. 2. 3rd Edith. Academic Press. USA.

Fujiwake, H., Suzuki, T., Oka, S., y Iwai, K. (1980). Enzymatic formation of capsaicinoid from vanillylamine and iso-type fatty acids by cell-free extracts of Capsicum annuum var. annuum cv. Karayatsubusa. Agricultural and Biological Chemistry, 44(12), 2907-2912.

Gallardo, M. L., y Elena, C. P. (1994). Desarrollo de las células piramidales del hipocampo de rata y estudio de su contenido en ADN. Universidad Complutense de Madrid.

Genazzani, A. D., Lanzoni, C., Ricchieri, F., Santagni, S., Rattighieri, E., Chierchia, E., y Jasonni, V. M. (2011). Acetyl-L-carnitine (ALC) administration positively affects reproductive axis in hypogonadotropic women with functional hypothalamic amenorrhea. Journal of endocrinological investigation, 34(4), 287-291.

Gerendai I., Banczerowski P. y Halasz B. (2005). Funtional significance of the Innervation of the gonads. Endocrine. 28(3): 209-318.

Gerendai, I. (1987). Laterality in the neuroendocrine system. In Duality and unity of the brain (pp. 17-28). Palgrave Macmillan, London.

Gerendai, I., y Halász, B. (1997). Neuroendocrine asymmetry. Frontiers in neuroendocrinology, 18(3), 354-381.

Gerendai, I., (1984). Lateralization of neuroendocrine control. In: Galaburda, A.M., Geschwind, N. (Eds.), Cerebral Dominance, Biological Foundations (pp.167–176). Harvard University Press, Cambridge, MA.

Gerendai, I., Kocsis, K., y Halász, B. (2002). Supraspinal connections of the ovary: structural and functional aspects. Microscopy research and technique, 59(6), 474-483.

Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogköi, Z., Medveczky, I., y Halász, B. (2000). CNS structures presumably involved in vagal control of ovarian function. Journal of the autonomic nervous system, 80(1-2), 40-45.

Gerendai, I., Tóth, I. E., Boldogkői, Z., Medveczky, I., y Halász, B. (1998). Neuronal labeling in the rat brain and spinal cord from the ovary using viral transneuronal tracing technique. Neuroendocrinology, 68(4), 244-256.

Gibb, R., y Kolb, B. (1998). A method for vibratome sectioning of Golgi–Cox stained whole rat brain. Journal of Neuroscience Methods. 79, 1-4.

Gómez, B. P., y Paniagua, M. V. (2002). Fisiología de la reproducción: hormona liberadora de gonadotrofinas. Revista de la Facultad de Medicina UNAM, 45(6), 252-257.

González, F., Cordero, N., Santos, N., López, G., Reyes, R., López, D., y Quiróz U. (2016). Efectos de la hemicastración sobre la fertilidad de la rata macho. Cartel #24. En M. L. (presidencia), XII Reunión anual de la academia de investigación en biología de la reproducción, A. C. Querétaro.

Greiner, M., Paredes, A., Araya, V., y Lara, HE (2005). Papel del estrés y la inervación simpática en el desarrollo del síndrome de ovario poliquístico. Endocrino, 28 (3), 319–324.

Hernández G. (2014). Participación de la inervación sensorial sobre la espermatogénesis de la rata. Tesis para obtener el grado de Biólogo. Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

Hernández, J. D. O., Aguilar, E. J., y García, F. G. (2015). El hipocampo: neurogénesis y aprendizaje. Rev Med UV, 21-28.

Hillier SG. (2001). Gonadotropic control of ovarian follicular growth and development. Molecular and cellular endocrinology, 179: 39-46.

Hiura A. (2000). Neuroanatomical effects of capsaicin on the primary afferent neurons. Archives of histology and cytology, 63(3), 199-215.

Hojo, Y., Hattori, T. A., Enami, T., Furukawa, A., Suzuki, K., Ishii, H. T., y Harada, N. (2004). Adult male rat hippocampus synthesizes estradiol from pregnenolone by cytochromes P45017α and P450 aromatase localized in neurons. Proceedings of the National Academy of Sciences, 101(3), 865-870.

Hösli, E., y Hösli, L. (1999). Cellular localization of estrogen receptors on neurones in various regions of cultured rat CNS: coexistence with cholinergic and galanin receptors. International journal of developmental neuroscience, 17(4), 317-330.

Ilhan, T., y Erdost, H. (2013). Effects of capsaicin on testis ghrelin expression in mice. Biotechnic y Histochemistry, 88(1), 10-18.

Ji, J., y Maren, S. (2008). Differential roles for hippocampal areas CA1 and CA3 in the contextual encoding and retrieval of extinguished fear. Learning y Memory, 15(4), 244-251.

Jones, L. L., McDonald, D. A., y Borum, P. R. (2010). Acylcarnitines: role in brain. Progress in lipid research, 49(1), 61-75.

Juraska, J. M., Fitch, J. M., y Washburne, D. L. (1989). The dendritic morphology of pyramidal neurons in the rat hippocampal CA3 area. II. Effects of gender and the environment. Brain Research, 479(1), 115–119.

Kjartansson, J., Dalsgaard, C.-J., y Jonsson, C.-E. (1987). Decreased Survival of Experimental Critical Flaps in Rats after Sensory Denervation with Capsaicin. Plastic and Reconstructive Surgery, 79(2), 218–221.

Krsmanović, L. Z., Virmani, M. A., Stojilković, S. S., y Catt, K. J. (1992). Actions of acetyl-L-carnitine on the hypothalamo-pituitary-gonadal system in female rats. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 43(4), 351-358.

Kwiecien, G. J. (2015). Fallopian Tube Anastomosis. In Plastic and Reconstructive Surgery (pp. 39-43). Springer, London.

Lau, T., Bigio, B., Zelli, D., McEwen, B. S., y Nasca, C. (2017). Stress-induced structural plasticity of medial amygdala stellate neurons and rapid prevention by a candidate antidepressant. Molecular psychiatry, 22(2), 227-234.

Lavenex, P., Lavenex, P. B., y Amaral, D. G. (2007). Postnatal development of the primate hippocampal formation. Developmental neuroscience, 29(1-2), 179-192.

Lawrence, I. E., y Burden, H. W. (1980). The origin of the extrinsic adrenergic innervation to the rat ovary. The Anatomical Record, 196(1), 51–59.

Liang, L. F., Qi, S. T., Xian, Y. X., Huang, L., Sun, X. F., y Wang, W. H. (2017). Protective effect of antioxidants on the pre-maturation aging of mouse oocytes. Scientific reports, 7(1), 1-10.

Lie, M. E., Overgaard, A., y Mikkelsen, J. D. (2013). Effect of a postnatal high-fat diet exposure on puberty onset, estrous cycle regularity, and kisspeptin expression in female rats. Reproductive biology, 13(4), 298-308.

Lorente de Nó, R. (1934). Studies in the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. Journal of Psychology and Neurology. 46, 111-117.

Malamed, S., Gibney, JA., y Ojeda, SR. (1992). Ovarian innervations develop before initiation of folliculogenesis in the rat. Cell y tissue research, 270, 87-93.

Matorras, R., Hernández, J., y Molero, D. (2008). Tratado de reproducción humana para enfermería (pp. 9-15). Madrid: Panamericana.

Meijide De la Fuente, S. (2017). Estado antioxidante del líquido folicular en mujeres sometidas a estimulación ovárica: implicaciones en la maduración folicular y en la fertilidad.

Moghadami, S., Jajanshahi, M., Sepehri, H., y Amini, H. (2016). Gonadectomy reduces the density of androgen receptor – inmunorreactive neurons in male rat's hippocampus: testosterone replacement compensates it. Behavioral and brain functions. 12(5).

Moore, K., Persaud, T., y Torchia, M. (2008). Embriología clínica (8th ed., pp. 23-27). Ámsterdam: Elsevier.

Morales-Ledesma, L., Betanzos-García, R., y Domínguez-Casalá, R. (2004). Unilateral or bilateral vagotomy performed on prepubertal rats at puberty onset of female rat deregulates ovarian function. Archives of medical research, 35(4), 279-283.

Morales-Ledesma, L., Ramírez, D. A., Vieyra, E., Trujillo, A., Chavira, R., Cárdenas, M., y Domínguez, R. (2011). Effects of acute unilateral ovariectomy to pre-pubertal rats on steroid hormones secretion and compensatory ovarian responses. Reproductive Biology and Endocrinology, 9(1), 41.

Morán, C., Morales, L., Quiróz, U., y Domínguez, R. (2000). Effects of unilateral or bilateral superior ovarian nerve section in infantile rats on follicular growth. Journal of endocrinology, 166(1), 205-211.

Morán, C., Morales, L., Razo, R. S., Apolonio, J., Quiróz, U., Chavira, R., y 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(16), 2113-2125.

Morán, C., Zarate, F., Morán, J. L., Handal, A., y Domínguez, R. (2009). Lateralization of the connections of the ovary to the celiac ganglia in juvenile rats. Reproductive Biology and Endocrinology, 7(1), 50.

Ojeda, S. y Skinner, M. (2006). Puberty in the Rat. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction, 2061–2126.

Palma G.A. (2001). Biotecnología de la Reproducción. 1ª Edición. Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

Pastelín, C. F., Rosas, N. H., Morales-Ledesma, L., Linares, R., Domínguez, R., y Morán, C. (2017). Anatomical organization and neural pathways of the ovarian plexus nerve in rats. Journal of ovarian research, 10(1), 18.

Paxinos, G., y Watson, C. (2006). The rat brain in stereotaxic coordinates: hard cover edition. Elsevier.

Picut, C. A., y Remick, A. K. (2016). Female Reproductive System. In Atlas of Histology of the Juvenile Rat (pp. 203-226). Academic Press.

Postiglione, A., Soricelli, A., Cicerano, U., Mansi, L., De Chiara, S., Gallotta, G., y Salvatore, M. (1991). Effect of acute administration of L-acetyl carnitine on cerebral blood flow in patients with chronic cerebral infarct. Pharmacological research, 23(3), 241-246

Prevot, V. (2015). Puberty in mice and rats. Knobil and Neill's Physiology of Reproduction. New York: Elsevier, 1395-1439.

Quezada, A. (1997). Introducción al manejo de animales de laboratorio: roedores y pequeñas especies. Ediciones de la Universidad Autónoma de Yucatán, Unidad de Ciencias Biomédicas México (pp, 62-64).

Quiróz, U., Morales-Ledesma, L., Morán, C., Trujillo, A., y Domínguez, R. (2014). Lack of sensorial innervation in the newborn female rats affects the activity of hypothalamic monoaminergic system and steroid hormone secretion during puberty. Endocrine, 46(2), 309-317.

Reyes-Mendoza, J., y Morales, T. (2016). Post-treatment with prolactin protects hippocampal CA1 neurons of the ovariectomized female rat against kainic acid-induced neurodegeneration. Neuroscience, 328, 58-68.

Rodríguez Solano, A. (2005). Guía de Laboratorio de Histología (1st ed., pp. 100-110). San José C.R.: Editorial de la Universidad de Costa Rica.

Ross, M., y Pawlina, W. (2007). Histología: Texto Y Atlas (5th ed., pp. 28-30). Buenos Aire: Medica Panamericana.

Sairam, MR. (1999). Gonadotropins, Overview. pp, 552-565. In: Knobil E. and Neill JD. (eds.). Encyclopedia of Reproduction Vol. 2. Academic Press. USA.

Sánchez, M. (2009). Efectos de los cuidado maternos sobre la actividad motora y la morfología dendrítica de las neuronas piramidales del hipocampo dorsal y las espinas medianas del núcleo accumbens. México: Tesis para obtener el título de Maestría en Ciencias Biológicas.

Sholl, D. A. (1953). Dendritic organization in the neurons of the visual and motor cortices of the cat. Journal of anatomy, 874), 387- 406.

Singh, S., Mishra, A., Mishra, S. K., y Shukla, S. (2017). ALCAR promote adult hippocampal neurogenesis by regulating cell-survival and cell death-related signals in rat model of Parkinson's disease like-phenotypes. Neurochemistry international, 108, 388-396.

Souccar, T. (2006). La Guía de los nuevos estimulantes (Vol. 4). Editorial Paidotribo

Tilly, J. L., y Tilly, K. I. (1995). Inhibitors of oxidative stress mimic the ability of follicle-stimulating hormone to suppress apoptosis in cultured rat ovarian follicles. Endocrinology, 136(1), 242–252.

Tomassoni, D., Di Cesare Mannelli, L., Bramanti, V., Ghelardini, C., Amenta, F., y Pacini, A. (2018). Treatment with acetyl-L-carnitine exerts a neuroprotective effect in the sciatic nerve following loose ligation: a functional and microanatomical study. Neural regeneration research, 13(4), 692–698.

Tóth, I. E., Wiesel, O., Boldogkől, Z., Bálint, K., Tapaszti, Z., y Gerendai, I. (2007). Predominance of supraspinal innervation of the left ovary. Microscopy research and technique, 70(8), 710-718.

Traina, G. (2016). The neurobiology of acetyl-L-carnitine. Front Biosci (Landmark Ed), 21, 1314-1329.

Trujillo, A., Morales, L., y Domínguez, R. (2015). The effects of sensorial denervation on the ovarian function, by the local administration of capsaicin, depend on the day of the o estrous cycle when the treatment was performed. Endocrine, 48(1), 321-328.

Urbanski, H. F., and Ojeda, S. R. (1985). In vitro simulation of prepubertal changes in pulsatile luteinizing hormone release enhances progesterone and 17β-estradiol secretion from immature ovaries. Endocrinology 117, 638–643.

Urbanski, H. F., and Ojeda, S. R. (1986). Development of afternoon minisurges of luteinizing hormone secretion in prepubertal female rats is ovary dependent. Endocrinology 118, 1187–1193.

Wilson, A. D., Hart, A., Wiberg, M., y Terenghi, G. (2010). Acetyl-l-carnitine increases nerve regeneration and target organ reinnervation–a morphological study. Journal of Plastic, Reconstructive y Aesthetic Surgery, 63(7), 1186-1195.

Woolley, C. S., y McEwen, B. S. (1993). Roles of estradiol and progesterone in regulation of hippocampal dendritic spine density during the estrous cycle in the rat. Journal of Comparative Neurology, 336(2), 293-306.

Woolley, C. S., Weiland, N. G., McEwen, B. S., y Schwartzkroin, P. A. (1997). Estradiol increases the sensitivity of hippocampal CA1 pyramidal cells to NMDA receptor-mediated synaptic input: correlation with dendritic spine density. Journal of Neuroscience, 17(5), 1848-1859.

Yao, H.H., y Bahr, J.M. (1999). Ovary, Overview. p. 590-605. In: Knobil E. and Neill JD. (eds.). Encyclopedia of Reproduction Vol. 3. Academic Press. USA.

Zvara A., Bencsik P., Fodor G., Csont T., Hackler L., Dux M., Fürst S., Jancsó G., Puskás L., Fedinandy P. (2005). Capsaicine-sensitive sensory neurons regulate myocardial function and gene expression pattern of rat hearts: a DNA microarray study. The FASEB Journal.